



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

**Identification of novel variants
associated with tacrolimus
concentrations in kidney transplant
patients by next generation sequencing**

차세대염기서열분석을 이용한 신장이식환자의
타크로리무스 농도와 연관된 새로운 유전형 발굴

2019 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 예방·임상·사회약학전공

손 민 지

차세대염기서열분석을 이용한 신장이식환자의 타크로리무스 농도와 연관된 새로운 유전형 발굴

손 민 지

약학과, 예방·임상·사회약학 전공

서울대학교 대학원

1. 서론

타크로리무스는 면역억제제로서 대부분의 고형장기 이식 환자에서 널리 쓰이고 있으나 치료 영역이 좁고 개인간 약동학적 변동이 커 개인맞춤 요법을 필요로 하고 있다. 체중 기준으로 투약을 시작하고 최저 약물농도측정(therapeutic dose monitoring, TDM)을 통해 용량을 조절함으로써 부작용을 최소화하고 이식편 거부반응을 줄이고 있다.

투여 초기부터 약물농도를 조절하기 위해 타크로리무스 약동학에 영향을 미치는 인자에 대한 연구가 다양하게 시행되었고, 병용약물, 유전형, 식이요법 및 화학적 랩 검사가 보고되었다. 유전형으로 CYP3A5 rs776746 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP), 인트론 3(6986 A>G, CYP3A5*3) 위치의 대립형질(allele), 이상 전령 리보핵산(messenger ribonucleic acid, mRNA) 스플라이싱을 통해 CYP3A5 효소의 발현을 조절함으로써 주요하게 약물 대사에 영향을 미친다. 본 유전형은 영향력이 크지만, 현재 40-50%만의 변이를 설명하므로 다른 유전형의 역할에 대한 연구들이 진행되었다. CYP3A4, POR, NR1I2, 그리고 SUMO4가 보고되었으나 여전히 타크로리무스의 약동학적

다양성에 대한 설명이 충족되고 있지 않다.

유전체 분석 기술이 발전함에 따라 광범위 유전체 연구와 차세대 염기서열분석(next generation sequencing, NGS)를 통해 잠재적인 새로운 SNP를 발굴하게 되었다. 따라서 본 기술을 통해 타크로리무스와 연관된 새로운 약동학 관련 유전자를 발견할 것으로 기대된다. 본 연구에서는 신장이식 환자에서 타크로리무스에 영향을 미치는 새로운 유전형을 알아내고자 하였다.

2. 연구방법

본 연구는 단일 기관 후향적 관찰 연구로 수행되었다. 2007년부터 2014년까지 서울대병원에서 신장이식을 새로 받은 18세 이상 성인 중 타크로리무스(Prograf®) 포함한 면역억제 삼중요법을 받는 환자가 포함되었다. 다장기 이식 또는 이식적 탈감작 요법을 받은 환자는 제외되었다. IRB 승인을 받아 총 147명 환자가 모집되어 75명은 발굴군, 72명은 재현군으로 분류되었다.

타크로리무스는 0.075 mg/kg 1일 2회로 이식전 시작하여 TDM에 따라, 이식후 1개월째 10–12 ng/mL, 3개월째 8–10 ng/mL, 6개월째 6–8 ng/mL, 이후 4–6 ng/mL로 용량이 조절되었다. 타크로리무스 농도는 액체크로마토그래피 질량분석법으로 측정되었다. 혈중 최고 농도는 1–3일, 4–7일, 8–14일, 15–28일, 1–3개월, 4–6개월, 7–12개월의 평균값으로 계산되었고 총 콜레스테롤, 적혈구, 총 빌리루빈, 알부민, 크레아티닌과 같은 임상변수 정보가 수집되었다.

대상환자의 혈액은 전향적으로 수집되어 QuickGene DNA kit로 유전적 데옥시리보핵산(genomic deoxyribonucleic acid, gDNA)를 추출하였다. Sure Select Human All Exon kit V5 + UTRs (Agilent) 키트를 통해 gDNA 표적부위를 캡처하여 증폭시켰다. Bioanalyzer를 통해 상태 검사후 Ion PI chip에 로딩하여 Ion Proton로 시퀀싱하였다. Torrent Mapping Alignment Program ver4.0.6으로 매핑하여 Torrent Variant Caller plugin ver4.4.3.3으로 서열을 호출하였다. 소수형질빈도(minor allele frequency, MAF)는 SNVrap을 통해 주석을 달았다. 차세대염기서열분석의 염기서열은 Sanger sequencing으로 검증하였다. 타크로리무스 영향 유전형 중 표적부위에 포함되지 않은 *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*,

CYP3A4, *CYP3A5*, *NR1I2*, *POR*, *PPARA*, *PPARD*, *SLCO1B3* 그리고 *SUMO4* 유전자의 19개 변이는 SNaPshot 또는 SNPtype assay로 별도로 분석하였다.

용량 보정 농도(C/D)는 타크로리무스 혈중 최저농도를 1일 투여용량으로 나눈 값으로 계산되었다. 상관분석을 위해 log 변환시켰고, ANOVA 선형 회귀분석을 부가모델(additive model)로 매 시점 분석되었다. 거짓발견비율(false positive rate, FDR)로 보정하여 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 판단하였다. 확인된 유전변이는 Hardy-Weinberg 평형 관계를 평가하였다. 선형혼합모형(linear mixed model, LMM) 분석을 통해 매 시점 유전형과 임상변수에 대한 관계를 보았다. Haploview 프로그램을 통해 일배체형(haplotype)과 연관 불평형(linkage disequilibrium, LD)이 측정되었다.

3. 연구결과

모집된 환자는 발굴군과 재현군에서 인구학적 특성의 유의한 차이를 보이지 않았다. 차세대염기서열 분석은 평균 측정(depth)이 57.78x(41.09-105.5)이었고, 표적부위에서 20x 이상 측정된 비율은 87.87%(77.87-96.09)이었다. 총 293,531개 변이가 확인되었다. 발굴군의 2,900개의 C/D 값과 변이 간 상관분석 결과 chromosome 3의 *NR1I2*, chromosome 7의 *PTCD1*, *CPSF4*, *ZNF789*, *ZKSCAN5*, *FAM200A*, *ZSCAN25*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, 그리고 *CYP3A4*가 확인되었다. FDR 보정 결과 총 16개 변이가 전기간 의미가 있었고 *CYP3A7* rs2257401의 C>G 변이가 3일째 가장 영향이 컸다(전기간 $p = 1.74 \times 10^{-7}$ and $p = 0.0138$).

Chromosome 7의 일배체형 분석 결과 *CPSF1* rs883403와 rs1043466, *ZNF789* rs6962772, *FAM200A* rs10238965, 그리고 *ZSCAN25* rs1859690가 한 블록, *ZSCAN25* rs3735453, *CYP3A5* rs15524와 rs776746, *CYP3A7* rs10211, rs12360와 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983가 각각 블록을 형성하였다.

재현군에서는 2,940개의 타크로리무스 농도가 수집되었고, 1인당 34(27-77)회 측정되었다. 발굴군에서 유의하게 측정된 변이 *CYP3A5* rs15524와

rs776746, *CYP3A7* rs10211, rs12360와 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983와 rs2242480가 분석되었다. 모든 변이가 유의하게 C/D에 영향을 미침이 확인되었다. *ZNF789* rs6962772, *FAM200A* rs10238965, 그리고 *CYP3A7* rs10211와 rs12360의 SNP이 동일함이 보여 향후 분석에서 제외되었다. LD 정도는 각각 *CYP3A7* rs2257401와 *CYP3A5* rs776746 ($r^2 = 0.79$)가 높고, *CYP3A4* rs2242480와 *CYP3A5* rs776746 ($r^2 = 0.50$)가 중등도이었다. 이에 이배체형(diplotype) 빈도를 확인하여 *CYP3A5* rs15524와 rs776746, *CYP3A7* rs10211와 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983로 CAGCA-CAGCA, TGAGT-TGAGT 및 그 외 서열은 각 9.3%, 45.3%, 44.2%이었고 TGAGT-TGAGT는 타크로리무스 C/D를 강하게 증가시켰다.

모든 환자군을 합쳐 LMM 분석을 한결과 최종적으로 *CYP3A7* rs2257401 유전형과 나이, 알부민, 적혈구용적율, 크레아티닌이 최종 포함되었다. *CYP3A7* rs2257401 변이의 영향을 확인하고자 *CYP3A5* 발현자와 비발현자로 구분하여 각 유전형과 C/D의 영향을 확인한 결과 *CYP3A5* 발현군에서도 *CYP3A7* rs2257401 변이가 타크로리무스의 C/D에 유의하게 영향을 미침을 확인하였다.

4. 결론

본 연구는 *CYP3A7* 유전형이 타크로리무스 C/D의 개인차에 강하게 연관됨을 입증하였다. 따라서, *CYP3A7* rs2257401 다형성이 신이식 환자에서 최적화된 개인 맞춤 타크로리무스 용량과 용법을 제시하는데 활용될 것으로 기대된다.

주요어 : 차세대염기서열분석, 선형혼합모형, 타크로리무스, 약물농도, 유전형, 신장이식

학 번 : 2013-30509

Table of Contents

국문초록	i
Table of Contents.....	v
Tables	viii
Figures	x
Chapter 1.Introduction.....	12
1.1. 신장이식 환자에서 면역억제제의 사용	12
1.1.1. 신장이식	12
1.1.2. 면역억제제	13
1.1.3. 타크로리무스	13
1.2. 타크로리무스의 약동학적 다양성	15
1.2.1. 타크로리무스의 약동학	15
1.2.2. 타크로리무스 약동학과 연관된 임상변수.....	18
1.2.3. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 바이오마커	19
1.2.4. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전자 바이오마커	23
1.2.5. 타크로리무스 약동학과 연관된 병용약물.....	24
1.3. 차세대염기서열 분석.....	25
1.3.1. 차세대염기서열분석의 발전.....	25
1.3.2. 전장엑솜분석	26
1.3.3. 비해독부위분석 및 인트론 분석	26
1.3.4. 생물정보학 분석	27
1.4. 선형혼합모형과 약동학 모델.....	28
1.5. 연구 목적	29
Chapter 2.Methods.....	30
2.1. 연구디자인 및 연구집단	30
2.2. 면역억제제 요법	33
2.3. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 분석	34

2.3.1.	타크로리무스 약동학 파라미터의 산출	34
2.3.2.	임상변수 자료 수집	34
2.3.3.	검체 수집 및 테옥시리보핵산 추출	35
2.3.4.	차세대염기서열 분석	35
2.3.5.	기보고된 유전형 분석	36
2.3.6.	생물정보학 분석	43
2.3.7.	시퀀싱 변이 호출 검증	43
2.3.8.	연관 분석	44
2.4.	타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 검증	46
2.4.1.	유전형 분석 및 자료 수집	46
2.4.2.	통계 분석	46
2.5.	선형혼합모형 분석	47
2.5.1.	기본 모형	47
2.5.2.	임상변수 모형 및 유전형 모형	47
2.6.	기타 통계 분석	48
Chapter 3.Results		49
3.1.	인구학적 특성	49
3.2.	시퀀싱 분석 결과	51
3.3.	타크로리무스 약동학과 연관된 유전형의 분석	53
3.4.	타크로리무스 약동학과 일배체형의 상관관계	63
3.5.	재현군에서 타크로리무스 약동학에 대한 유전형의 영향 검증	67
3.6.	CYP3A5 발현군에서의 CYP3A7 rs2257401의 효과	71
3.7.	기본 모형	73
3.8.	임상변수 선형혼합모형의 구축	73
3.9.	최종 선형혼합모형	78
Chapter 4.Discussion		83
4.1.	결론	89
참고문헌	90

Abstract	103
----------------	-----

Tables

Table 1. Genetic variants related to tacrolimus pharmacokinetics.....	22
Table 2. The oligonucleotide primers and melting temperature (T _m) used for SNaPShot assays	38
Table 3. The oligonucleotide primers for the SNPtype assay	40
Table 4. The oligonucleotide primers used for Sanger sequencing.....	45
Table 5. Baseline demographic characteristics for included subjects.....	50
Table 6. Summary of exome sequencing quality and exome variant metrics (N = 75)	52
Table 7. Allele frequencies of variants associated with daily dose-adjusted tacrolimus trough levels in the discovery set.....	57
Table 8. Association of variants with daily dose-adjusted tacrolimus trough levels by the analysis of variance of linear regression in the discovery set (N=75)*	60
Table 9. Tacrolimus trough levels over time according to genotypes in the discovery set (N=75)	61
Table 10. Diplotype frequencies of CYP3A5 rs15524 and rs776746, CYP3A7 rs10211 and rs2257401, and CYP3A4 rs123339839 in the discovery set (N=75)	65
Table 11. Tacrolimus trough levels over time according to haplotypes of CYP3A5 rs15524 and rs776746, CYP3A7 rs10211 and rs2257401, and CYP3A4 rs123339839 in the discovery set (N=75)	66
Table 12. Allele frequencies of CYP3A4, CYP3A4, and CYP3A7 in the replication set (N=72)	68
Table 13. Tacrolimus trough levels over time according to genotypes in the replication set (N=72)	69
Table 14. Tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in CYP3A7	

rs2257401 genotypes classified by different patients expressing CYP3A5.....	72
Table 15. Blood biochemistry data of patients at different time points after transplantation	75
Table 16. Linear mixed model with clinical variables for log transformed tacrolimus dose-adjusted trough concentrations	77
Table 17. Results of the final linear mixed model for tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients.....	79
Table 18. Final linear mixed effect model with rs2257401 adjusted with clinical variables	82

Figures

Figure 1. Tacrolimus pharmacokinetic pathway modified by PharmGKB..	17
Figure 2. Patient enroll process.....	32
Figure 3. Manhattan plots of variants associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations on day 7 after transplantation. The dotted horizontal line shows the cutoff for $p = 0.05$ after the false discovery rate correction.	55
Figure 4. Alignment of exome sequences showing (A) CYP3A7 rs2257401 variant, (B) CYP3A7 rs12360 variant, and (C) CYP3A5 rs15524 variant by Integrative Genomics Viewers.....	56
Figure 5. Heat map plots of variants commonly associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations from day 3 to 1 year after transplantation. The color was rescaled on the basis of adjusted P value of variants associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations (black, high significant association; white, low significant association).	58
Figure 6. Dose adjusted tacrolimus trough concentrations in patients after kidney transplantation. Solid, dotted, dashed lines indicated the mean of dose adjusted tacrolimus trough concentrations in CYP3A7 rs2257401 GG carriers, CYP3A7 rs2257401 CG carriers, and CYP3A7 rs2257401 CC carriers, respectively	59
Figure 7. Haplotype plots of variants on chromosome 7 commonly associated with tacrolimus trough concentrations from day 7 to 1 year after transplantation.....	64
Figure 8. Distributions of log transformed dose-adjusted tacrolimus concentrations in (A) Discovery group and (B) Replication group at each time point.....	74

Figure 9. Relationship between clinical variables and tacrolimus dose– adjusted trough concentrations in all data set	76
Figure 10. Residual plot for each LMM (A) model 5 and (B) model 6 in day 3.....	81

Chapter 1. Introduction

1.1. 신장이식 환자에서 면역억제제의 사용

1.1.1. 신장이식

신장이식(kidney transplantation)이란 만성신장질환으로 회복 불가능한 말기신부전 단계로 진행하여 시행하는 신대체요법의 하나로, 정상 신기능을 가진 공여자의 신장으로 대체함으로써 신장 기능을 회복하는 치료방법이다. 다른 신대체요법인 투석에 비해 신기능 회복에 따른 요독 제거 효율 개선과 빈혈, 미네랄 골질환, 전해질 불균형 등의 합병증 회복이 기대되고, 시간적 제약이 없어 환자의 삶의 질 개선으로 선호되는 치료요법이다. 신장이식 후 첫해에는 수술 비용 및 초기 관리 비용(면역억제제 고용량 사용, 잦은 외래 방문 등)에 의해 의료비가 크나 이후 매년 관리비는 감소하여 2년째부터는 투석비용보다 적어져 경제적으로도 효율적이다.(1, 2) 만성질환이 증가와 수명이 연장됨에 따라 말기신부전 환자가 점차 증가하고 있으며, 간, 심장 등의 다른 장기에 비해 이식 건수가 가장 높다.(3) 신장이식 대기자 수도 늘어나고 있어 한번 이식 받은 장기를 최대한 장기간 유지하는 것이 중요하다. 이식 후 말기신부전으로 재이행이 되더라도 다회 신장이식이 가능하나 이식횟수가 증가함에 따라 면역 반응 위험이 상승하고 이식편 생존율이 감소하므로 이식 초기부터 이식성과 향상을 위한 관리가 매우 중요하다.(4)

1.1.2. 면역억제제

체내 면역 체계는 이식편의 주조직적합복합체(major histocompatibility complex)의 사람백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA)을 인지하여 T세포 활성화 또는 항체 생성을 통해 세포를 공격하고 이를 거부반응이라 한다. 면역억제제는 이러한 거부반응을 예방하고 신장 기능을 보존하기 위해 매우 중요하다. 국제 비영리 신장 연구재단인 Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO)에서 발간한 신장이식 지침에서는 초기 면역억제 요법으로 칼시뉴린 저해제와 항증식제 그리고/또는 코르티코스테로이드를 사용하도록 권고하였다(KDIGO, 1B).(5) 또한, 장기 면역억제 요법으로 칼시뉴린 저해제를 유지하는 것이 필요하다. 최근 칼시뉴린 저해제의 독성으로 인해 다른 면역억제 요법들이 연구되었으나, 이를 완전히 대체하거나 배제한 요법에서 신기능이나 이식 실패의 예후가 좋지 않아 여전히 주요 면역억제제로 요구된다.(6)

1.1.3. 타크로리무스

타크로리무스(tacrolimus 또는 FK506)는 칼시뉴린 저해제 중 하나로 고형장기이식에서 가장 많이 사용되고 있다.(7) 타크로리무스는 T 세포내에서 FK-결합 단백질-12(FK-binding protein-12)와 결합하여 복합체로서 칼시뉴린의 대사 활성을 억제하고 유전자 발현과 연관된 중간체 생성을 저해함으로써 IL-2와 같은 시토카인 분비를 조절하여 면역작용을 저해한다. 타크로리무스를 사용함에 따라 거부반응

비율이 성공적으로 감소하고 이식 결과도 향상시켜 칼시뉴린 저해제 중 1차 치료제로 사용하도록 권고되고(KDIGO, 1A), 실제로 신장이식 환자의 약 85% 이상으로 가장 많이 사용되고 있다.(8, 9) 초기 투여 용량은 체중 기반하여 제시되어 있으나 약동학적 개체 차가 다양하고 치료역(therapeutic index)이 좁아 치료약물농도 모니터링을 필요로 한다. 약동학 연구에 타크로리무스 혈중 최저농도(trough concentration, C_0)가 혈중 약물농도곡선하면적(area under the concentration-time curve)과 연관되는 것으로 보고되어 농도 모니터링으로 C_0 가 사용되고 있다(유효 혈중농도 5–20 ng/mL).(10) 타크로리무스 약물농도 측정법으로 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)과 액체 크로마토그래피 – 직렬 질량분석법(liquid-chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)이 있으며 LC-MS/MS는 대사체를 제외한 활성형 모약물만 측정 가능하여 RIA보다 상대적으로 값이 약 20% 낮고, 임상적으로 유용하다.

타크로리무스 약물 농도가 높은 경우 부작용으로 당뇨, 신경독성 또는 신독성 등이 나타날 수 있으며 낮은 경우 거부반응과 이식편 실패를 유발할 수 있다.(11–13) 이식후 1개월 내, 3일 이내의 낮은 농도도 급성 거부반응과 연관되는 것으로 보고되어 초기부터 유효농도로 맞추는 것이 매우 중요하다.(14, 15)

1.2. 타크로리무스의 약동학적 다양성

1.2.1. 타크로리무스의 약동학

타크로리무스의 비대사체가 약력학적 효과를 지니고 생체이용률이 낮아, 약동학적 경로를 파악하는 것이 매우 중요하다. 고형장기이식에서 타크로리무스는 경구제로 투여되고 경구 생체이용률은 약 17-31%이다.(16) 타크로리무스는 장에서 흡수되어 약 1시간 전후로 혈중 최대 농도에 도달한다.(17) 타크로리무스는 개인간 흡수율의 차이를 보이고, 인종, 소장이식에서의 열린 소공 또는 식이에 의해 감소한다. 또한, 장에서 p-glycoprotein에 의해 소장 내강으로 방출될 수 있다.

CYP3A4와 CYP3A5 효소에 의해 주로 대사되고, 이는 소장과 간에 다수 발현되어 있다. CYP3A 군이 약물 대사에 영향을 미치는 것으로 확인되었는데, CYP3A 군에는 CYP3A4와 CYP3A5에 더불어 CYP3A7, 그리고 CYP3A43을 포함하고 231 kb로 chromosome 7q21 - q22.1에 위치한다. CYP3A4가 가장 먼저 발견되었고 CYP3A5와 CYP3A43이 간에서 분리되었다. CYP3A7 효소는 태아에서 가장 많이 발현되어 알려지게 되었다.(18)

간에서 대사되고 남은 약물이 최종 전신 순환 혈액에 도달하고 약 99%의 약물이 생물학적 분자들, 적혈구, 알부민 등과 결합하여 약물 분배에 영향을 받는다. 적혈구와 결합한 약물의 해리는 장기로 확산되는 시간보다 늦어 간대사를 저해한다. 타크로리무스는 대부분 담즙으로 제거되며 약 5%의 소량이 신장으로 배설된다. 담도가 폐쇄된 경우 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고되었다.(19)

요약하면, 타크로리무스는 비대사체가 활성형을 지니므로 장과 간에서의 배설과 대사를 통과하여 전신순환에 도달한 약물이 최종 림프구에 도달하여 약리학 작용을 나타낸다(Figure 1). 타크로리무스는 림프구 내에서 FK506 결합단백질(FKBP)과 결합해 탈인산화효소(phosphatase)인 칼시뉴린을 억제하고 전사인자 활성화 T-세포의 핵 인자(nuclear factor of activated T cell, NFAT)가 핵 내로 이동하는 것을 저해함으로써 인터루킨-2와 같은 시토카인 분비를 억제한다.

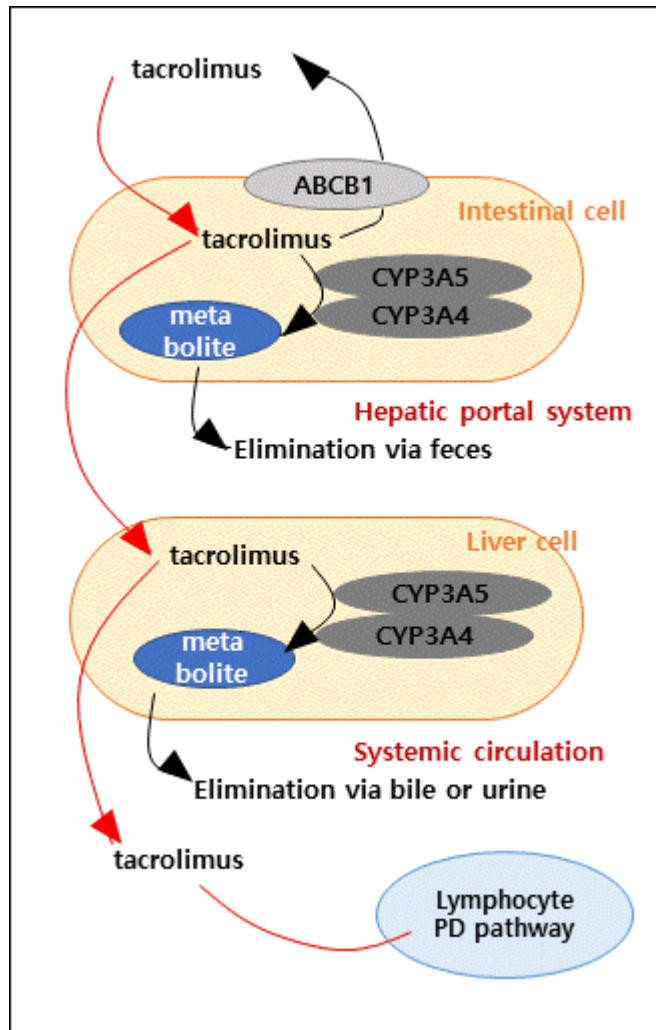


Figure 1. Tacrolimus pharmacokinetic pathway modified by PharmGKB

1.2.2. 타크로리무스 약동학과 연관된 임상변수

타크로리무스의 약동학 개인차에 대해 다양한 임상변수들이 연구되었다. 상당수 타크로리무스의 약 대사와 연관되었다. 성인과 소아의 차이로, 동일 혈중농도를 위해 소아에서 약 2배이상의 용량이 요구되는 것이 보고되었다. CYP3A4가 출생 후 급격히 활성화되고, CYP3A5 발현은 성인이 소아 보다 낮았다. 간의 대사에 의해 주로 설명되나 장의 대사와 배설 등에 대한 다른 이해는 부족하다. 적혈구 또는 알부민과의 결합은 약물 청소율을 낮추므로 각 값이 약물 농도에 영향을 미쳤다.(20) 인종의 경우, African-American에서 가장 높은 타크로리무스 약물 용량이 요구되었는데 이는 CYP3A 효소와 p-glycoprotein의 활성화에 의한 것으로 확인되었다. 간 기능이 나쁜 경우, 타크로리무스 청소율이 67% 가량 감소하였고 반감기도 늘어났다. 그러나 경증으로 손상된 경우 건강인에 비해 차이를 보이지 않았다.

또한 이식후 시간에 따라 영향이 확인되었다. 여러 장기 이식에 대한 연구에서 동일 용량을 맞추기 위해 시간이 지나면 비교적 적은 투여 용량이 요구되었다. 이는 시간 경과에 따라 타크로리무스의 청소율이 감소하고 생체이용률이 증가하고 병용약물의 사용과 알부민과 같은 임상지표의 영향을 받는 것으로 해석되었다.(20, 21) 신기능에 대해서는 현재 의견이 분분하다. 이식전 투석시와 이식후 회복된 신기능에서 크레아티닌의 차이가 영향이 없음이 보고된 바 있으며,(22) 혈장 약물 농도와 비례하기도 하였다.(23)

1.2.3. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 바이오마커

신장이식 환자에서 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형은 현재 다수 보고되었다(Table 1). 가장 잘 알려진 유전자는 *CYP3A5*로 intron 3에 위치한 rs776746은 6986A>G (*CYP3A5*3*) 염기 치환이 비정상적인 mRNA 절단을 유도하여 *CYP3A5* 효소 활성을 저해하는 것이 알려졌다.(24) *CYP3A5* 효소 기능 상실과 연관된 표현형 중 *CYP3A5*6*, *CYP3A5*7*도 타크로리무스와의 연관성이 확인되었다. 최근 유전형 맞춤 치료요법을 제안하는 Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) 가이드라인에서는 야생형(wild-type)인 *CYP3A5*1* 대립형질(allele)을 포함하는 *CYP3A5* 발현군과 그 외 *CYP3A5* 비발현 군으로 분류하여 발현군에서는 타크로리무스 투여 용량을 약 1.5-2배 증량할 것을 권고하였다.(25) *CYP3A5*가 크게 기여하여 타크로리무스 약동학의 약 40-50% 정도를 설명하지만,(26) 여전히 상당 부분 나타나는 개인 차에 대해 예측이 어려워 임상 현장에서 잘 활용되지 못하고 있다.

*CYP3A4*는 대표적인 대사 효소를 코딩하는 유전자로 기능과 연관된 변이 intron 6에 위치한 rs35599367이 6C>T (*CYP3A4*22*) 치환으로 *CYP3A4* mRNA 수치를 변화시키는 것이 먼저 보고되었다.(27) *CYP3A4*1B*는 rs2740574 -392A>G 변이로 *CYP3A4* 활성 증가와 연관되나 타크로리무스 약동학의 영향의 보고가 달라 메타분석이 수행되었다. 아시아 지역에서 변이 빈도가 적었고, Caucasian에서 특히 타크로리무스 용량 및 약동학에 영향을 미치는 것이 확인되었다.(28)

*CYP3A7*은 *CYP3A* 군에 포함된 유전자로 유사하게 영향을 미칠 것으로 예상되고 *CYP3A7*1C* 는 mRNA 발현을 증가시키는 것이 보고되었으나, 영향은 아직 불분명한 것으로 보인다.(29) *In vitro* 연구에서 *CYP3A7* 효소와 타크로리무스 결합이 낮은 것으로 보였으나, 유전변이의 *CYP3A5*와 동등한 효과 크기가 보고되기도 했다.(30, 31)

약물 수송체와 연관된 유전자로 *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *SLCO1B1*이 보고되었다. *ABCB1*은 *MDR1* (*multidrug resistance* 1)으로 불리며 p-glycoprotein을 암호화하는 유전자로 소장 이외에도 신장 등에 발현되어 타크로리무스의 흡수와 배설에 모두 영향을 미친다.(32) 소장에는 그 외에 다약제내성 단백질(*multidrug resistance-associated protein 2*, *MRP2*)이 존재하여 약물 흡수를 억제하는데, 이는 *ABCC2*에 암호화되고 유전형 변이가 타크로리무스 약동학에 영향을 미치는 것이 보고되었다.(33) 유기 음이온 수송 폴리펩타이드(*organic anion transporting polypeptide*, *OATP*)는 다양한 조직에서 세포 내 약물의 섭취(*uptake*)에 관여해 전신 혈중 농도에 영향을 미친다. 각 *OATP* 종류는 *SLCO* (*solute carrier*) 유전자 군에 암호화되며, *SLCO1B3* 유전형이 초기 타크로리무스 약물 농도와의 관계가 확인됐다.(34)

타크로리무스를 대사하는 *CYP3A* 효소 활성과 연관된 유전자로 *POR*, *PPARA*, *NR1I2*, *NR1I3*가 연구되었다. P450 oxidoreductase인 *POR*은 *CYP3A* 군 외에도 다양한 시토크롬 *CYP1A2*, *CYP2C19*의 활성을 조절한다.(35) *PPARA*의 rs4253728 c.209-1003G>A와 rs4823613 c.208 + 3819A>G 유전변이는 사람의 *CYP3A* 활성을 약 8-9% 조절하는 것으로 밝혀졌다.(36) *NR1I2*은 pregnane X receptor

(PXR)을, *NR1I3*는 constitutive androstane/active receptor (CAR)을 코딩하는 유전자로 표적 유전자의 프로모터와 유사한 구조와 결합하여 생체이물(xenobiotic) 대사와 수송체와 연관된 약 150개 이상의 유전자의 발현을 조절하고 이에 *CYP3A4*, *CYP3A5*, 그리고 *ABCB1*이 포함된다.(37)

또한 상호작용이 있는 병용약물의 대사에 영향을 미치는 유전형이 타크로리무스의 약물 농도에 영향을 미치는 것이 보고된 바 있다. *HSD11B1*은 병용약물인 스테로이드 제제의 대사과정 중에 prednisone에서 prednisolone으로 변환시키는 효소의 활성화와 연관되어 농도에 영향을 미친 것으로 해석된다.(38) 약동학 관련 유전형이 이식 예후로 거부반응이나 이식실패 등에 영향을 미치는 연구 결과는 다소 의견이 분분하다.

위와 같이 타크로리무스 약동학에 영향을 미치는 유전형들이 다수 확인되었으나 연구마다 상반된 결과를 보이기도 하며, 단일 연구에서만 그 효과가 확인된 유전형들이 존재한다. 또한, 인종별 차이도 존재하므로 기존에 보고된 유전형이더라도 다른 집단에서 이를 종합적으로 입증하는 것이 요구된다.

Table 1. Genetic variants related to tacrolimus pharmacokinetics

Genes	Variants
<i>ABCB1</i>	rs1128503, rs229109, rs3213619, rs2032582, rs1045642
<i>ABCC2</i>	rs2804402,rs3740066,rs2273697,rs717620
<i>CYP3A4</i>	rs2740574, rs12333983, rs2242480, rs6956344, rs138105638, rs35599367, rs4646437, rs28371759, rs1851426,rs2687116,rs4986910
<i>CYP3A5</i>	rs776746,rs15524,rs10264272,rs41303343
<i>CYP3A7</i>	rs2257401
<i>CYP3A1</i>	rs2177180
<i>HSD11B1</i>	rs846908,rs846910,rs4844880
<i>NR1C2(PPARD)</i>	rs2267668
<i>NR1I2(PXR)</i>	rs6785049,rs3814055,rs2276707
<i>NR1I3(CAR)</i>	rs55802895,rs11584174
<i>POR</i>	rs2868177,rs1057868
<i>PPARA</i>	rs4823613,rs4253728
<i>SLCO1B1</i>	rs2306283,rs4149056
<i>SLCO1B3</i>	rs4149117,rs7311358
<i>SLCO2B1</i>	rs2851069
<i>SUMO</i>	rs237025,rs237024

1.2.4. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전자 바이오마커

유전자 변이는 블록 단위로 일정 거리 내의 염기가 기대치 이상으로 연관되어 발생하는 성질을 지닌다. 유전형은 단일 변이로도 의미를 지니지만, 이러한 연관불균형(linkage disequilibrium, LD) 관계에 있는 다른 유전형과의 일배체형을 분석하는 것도 중요하다. 대표적으로 *ABCB1* 유전자는 C1236T, G2677T, 그리고 C3435T 염기 변이의 일배체형이 확인되었고, 폐이식과 소아 간이식에서 타크로리무스 약물 농도에 영향을 미치는 것이 보고되었으나,(39, 40) 중국인 신장이식 환자에서는 본 일배체형이 연관성을 보이지 못하였다.(41)

염기 삽입과 결손(insertion and deletion, indel) 또한 주요 유전자 바이오마커로, SNP 만큼 흔하지는 않으나 코딩 부위에서 발생하는 경우 아미노산 변이 및 단백질 특성 변화에 직결된다.(42) 타크로리무스 약동학 바이오마커로서 유전형 외에는 아직 밝혀진 바가 많지 않아 유전체 서열 결과를 다양하게 분석해 볼 필요가 있다.

1.2.5. 타크로리무스 약동학과 연관된 병용약물

타크로리무스를 경구 복용하게 되면 여러 요인들의 영향을 받을 가능성을 갖는데, 흡수 과정 중 장내 pH와 위 배출속도에 영향을 미치는 약물, 장내 내강 지질 용해도에 영향을 주는 약물, 유출 역할을 하는 p-glycoprotein의 기능을 조절하는 약물, 그리고 제 1상 및 제 2상 대사를 조절하는 약물 등으로 다양하다. 그 중 타크로리무스가 CYP3A4와 CYP3A5 효소로 대부분 대사되므로 강력한 상호작용을 가지는 약물은 대부분 이 효소의 억제 또는 유도와 연관되어 있다. CYP3A4를 억제하는 약물군은 대표적으로 azole계 항진균제, 칼슘통로차단제, 마크로라이드 항생제, 단백질분해효소 억제제 등이 있다.(43) CYP3A4 유도제로는 항경련제, 결핵약 등이 존재한다. 약물이 직접적으로 효소 작용에 영향을 미치지 않더라도 동일한 효소에 대사되는 경우 경쟁 작용으로 대사를 저해하는 경우가 있다(예, 양성자펌프 억제제).(44) 동일 계열이더라도 약제별 효소나 단백질과의 작용 및 결합이 상이하므로 개별로 검토해야 한다. 약물 외에 음식이 있는 경우 장내 흡수를 저해하고, 자몽주스는 CYP3A4 효소를 억제하므로 평소에 복용하지 않도록 주의해야 된다.

1.3. 차세대염기서열 분석

1.3.1. 차세대염기서열분석의 발전

시퀀싱은 유전자 염기를 긴 서열로 분석하는 유전형 분석방법이다. Sanger 시퀀싱이 기본 분석방법으로 정확도에 의해 표준 시퀀싱 방법(gold standard)으로 알려져 있으나, 전기영동 방법을 이용하여 분석 속도가 상대적으로 느리고 한번에 읽을 수 있는 염기 길이가 제한되어 있다. 차세대염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)는 복제한 서열은 다른 방법으로 읽는 진보된 분석법으로 현재 각 분석법에 따라 다양한 플랫폼이 개발되어 있다. Life Technologies사에서 개발된 시퀀서인 Ion TorrentTM, Ion ProtonTM, Ion PGMTM의 경우, 염기서열 복제시 양이온을 탐지한다. 즉, 삼인산 데옥시뉴클레오시드(deoxynucleoside triphosphate, dNTP)가 DNA 서열에 결합하면서 발생하는 pH 변화를 탐지한다.

단일 서열을 측정하는 것보다 시퀀싱을 통한 서열을 확인하는 분석법의 이점은 유전형 변이뿐만 아니라, 구조 변이(structural variant), 복제수변이(copy number variant), 유전자 융합(gene fusion), 삽입/결손을 탐지할 수 있고 희귀 변이를 새로 발견할 수 있다. 유전자 분석 방법의 민감도를 높이기 위해 시퀀서로 판독(read)의 횟수를 늘려 각 염기서열의 호출 횟수를 depth(X)로 나타낼 수 있다.(45, 46)

1.3.2. 전장엑솜분석

엑손은 유전자 내 코드화된 부위로 단백질의 아미노산에 대한 정보를 함유하고 있다. 엑솜은 전체 엑손을 지칭하는 용어로 사람 유전체의 약 1%만 차지한다. 이러한 낮은 분포에 비해 질병 관련 유전변이의 약 85%를 차지하고 있다.(47) 전장엑솜분석(whole exome sequencing, WES)는 엑손만을 표적하는 유전체라이브러리 분석을 진행하는 NGS 방법이다. 최근에는 엑손이 대부분의 유전자 표현형에 관여할 것으로 기대되어 분석 속도가 빠르고 제한된 예산 내에서 표적부위의 민감도를 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

1.3.3. 비해독부위분석 및 인트론 분석

비해독부위(untranslated region, UTR)는 유전자 서열이 mRNA로 전사되고 단백질로 번역되지 않는 부위이다. 해독 서열 양끝에 존재하여 시작 위치인 5' -UTR과 종료 위치인 3' -UTR로 분류된다. 3' -UTR은 RNA 결합단백질의 표적 영역으로 microRNA 등은 해당부위에 결합함으로써 단백질 번역 비율과 속도에 연관되는 mRNA의 발현을 조절한다.(48) 5' -UTR이 단백질로 번역되는 경우도 있으나 대부분 번역되지 않고 이차 구조를 형성하여 번역과 mRNA의 핵외수송(export)을 조절한다.(49) 인트론은 최종 RNA 산물을 만드는 과정에서 스플라이싱을 통해 제거되는 위치이다. 비록 전사되어 단백질이 되지는 않지만, 유전자 발현에 조절에 중요한 역할을 한다. 일부는 비암호화(noncoding) RNA 분자를 인코딩하고, 스플라이싱의

조절이 단일 유전자에서 다양한 단백질을 생성할 수 있도록 한다.(50)

따라서, 유전형 바이오마커로서 엑손 외 영역 분석도 중요성이 대두되나, 아미노산 대체 및 단백질 기능 변화로 설명이 가능한 엑손 변이에 비해 비교적 인트론 변이는 기능이 없을 것으로 예상되거나 역할이 잘 알려져 있지 않아 전장유전체분석보다는 전장엑솜분석이 선호되고 있다.

1.3.4. 생물정보학 분석

사람 데옥시리보 핵산(deoxyribo nucleic acid, DNA)은 약 2만 개의 유전자, 약 30억 쌍의 염기로 구성되어 있다. 차세대염기서열 분석을 통해 조각화된 DNA 정보를 빠르게 분석하게 되었으나 이러한 방대한 정보의 오류를 점검하고 순서대로 정렬(alignment)하는 기술이 필요하게 되었다. 이러한 정보처리 기술을 생물정보학이라 한다.

차세대염기서열 분석 원자료는 fastq로 염기서열과 분석 질을 함께 기록한 파일이다. 생물정보학 기본 분석 과정은 염기 호출(base calling), 정렬(alignment), 변이 호출(variant calling), 주석달기(annotation) 등으로 진행된다. 염기 호출의 정확도를 위해 동일 위치를 반복적으로 측정하고 이를 depth로 제시한다. 사람 유전체 지도가 완성되어 정렬은 대부분 hg19 또는 hg38 서열과 대조하여 나열한다. 원하는 표현형 비교분석을 위해 변이를 호출하고, 변이의 정보를 유전자, 단백질 등의 해석 가능한 정보와 결합하는 주석달기 과정을 진행한다. 분석 오류를 최소화하기 위해 지속적으로 새로운 툴과 파이프라인이 개발되고 있다.

1.4. 선형혼합모형과 약동학 모델

선형혼합모형(linear mixed effect model, LMM)은 예상하는 요인들에 대한 고정효과(fixed effect)와 임의로 추출된 표본의 특성을 반영하는 임의효과(random effect)를 모두 포함하는 모형으로, 반복측정자료와 같이 반응 변수 사이에 상관성이 있는 자료 분석에 사용된다. 선형혼합모형은 약력학 분석이나 약동학 지표의 통계적 분석에서 주로 활용되며, 비선형혼합모형에서 잘 설명되지 않는 경우에도 대체 분석법으로 사용되기도 한다.(51) 유전체 연구에서 선형혼합모형이 일반 선형회귀분석보다는 정확도가 더 높은 것으로 알려져 자주 사용된다.(52) 적합한 모형을 선택하기 위해 우도함수(likelihood function)을 이용하며, 그 중 가장 많이 사용되는 방법은 아카이케 정보 기준(Akaike Information Criterion, AIC), 베이지안 정보기준(Bayesian Information Criterion, BIC), 최대가능도방법(또는 최대 우도법; maximum likelihood method, MLE)이다. MLE는 값 차제를 비교하고 AIC와 BIC는 데이터 수, 파라미터 수를 반영하여 과적합(overfitting)을 고려하여 모델을 선택하도록 한다.

1.5. 연구 목적

기존 연구 결과를 바탕으로 타크로리무스 약동학에 영향을 미치는 영향 요소로 유전형이 크게 관여할 것으로 기대된다. 알려진 약동학 유전형 자료를 사용하여 의미 있는 유전형이 분석된 사례는 있으나, 새로운 유전형 발굴이 가능한 차세대염기분석 기술이 적용된 바는 아직 없다.

따라서 본 논문에서는 전장엑솜분석과 기보고된 유전형을 함께 분석함으로써 종합적으로 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형을 제시하고 이를 검증하고자 하였다. 또한, 확인된 유전형을 바탕으로 다른 임상변수와 함께 선형혼합모형을 통해 타크로리무스 약동학 지표를 설명하는 방법을 제안하고자 하였다.

Chapter 2. Methods

2.1. 연구디자인 및 연구집단

본 연구는 서울대병원 단일 연구기관에서 후향적 코호트 연구이다. 주요 결과변수는 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형을 분석하여 이를 검증함으로써 바이오마커로 제안하는 것, 2차 결과변수는 유전형 외의 관련 임상변수를 포함하여 선형혼합모델은 제안하는 것으로 설정하였다. 연구 집단은 차세대염기서열분석을 통해 유전형을 탐색하는 발굴군(discovery set)과 유의한 유전형을 검증하는 재현군(replication set)으로 분류되었다. 차세대염기서열 분석을 위한 별도의 표본수 산출 방법이 없으므로, 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형을 검정하기 위한 표본수는 Genetic Power Calculator로 기존에 체계적 문헌고찰로 보고된 *CYP3A5* rs776746의 질병 위험과, 본 디자인에서는 타크로리무스 용량이 2배로 요구되는 환자의 비율, 소수 대립유전자 빈도(minor allele frequency, MAF)에 따라 추정되었다.(53) 제 1종 오류 0.05, 80%의 검정력으로 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형으로 형질 빈도 0.25을 확인하는데 케이스가 40명 필요하므로, 1:1로 추정하며 80명으로 산출하였다.(54) 재현군도 같은 방법으로 표본수를 산출하므로 동일한 환자수를 목표로 하였다.

연구대상자는 18세 이상 성인으로 본 연구기관에서 신장이식을 받은 한국인 환자 중 타크로리무스(Prograf®, Astellas Pharma Korea, Inc., Seoul, Korea)를 포함한 미코페놀레이트 및 스테로이드를 병용한 삼중요법을 투여한 환자이다. 그 중 혈액형 불일치 이식이나 HLA

항체에 대한 탈감작 요법을 받거나 여러 장기를 이식 받은 경우 제외되었다.

2007년 1월부터 2014년 9월까지 신장이식을 받은 환자 530명을 스크리닝하였다(Figure 2). 연구대상자 371명 중 본원을 여전히 방문하는 317명을 대상으로 약 6개월 동안 발굴군과 재현군 순차적으로 연구 참여를 위한 연구계획서와 혈액수집 및 유전형분석의 인체유래물 연구 동의서에 동의한 환자를 모집하였다. 총 147명이 모집되었고, 75명과 72명이 각 두 군에 분류되었다. 본 연구는 서울대병원 연구윤리 위원회의 승인을 받아(IRB No. C-1504-009-662), 의약품임상시험관리기준(good clinical practice, GCP) 가이드라인과 헬싱키 선언에 따라 수행되었다.(55)

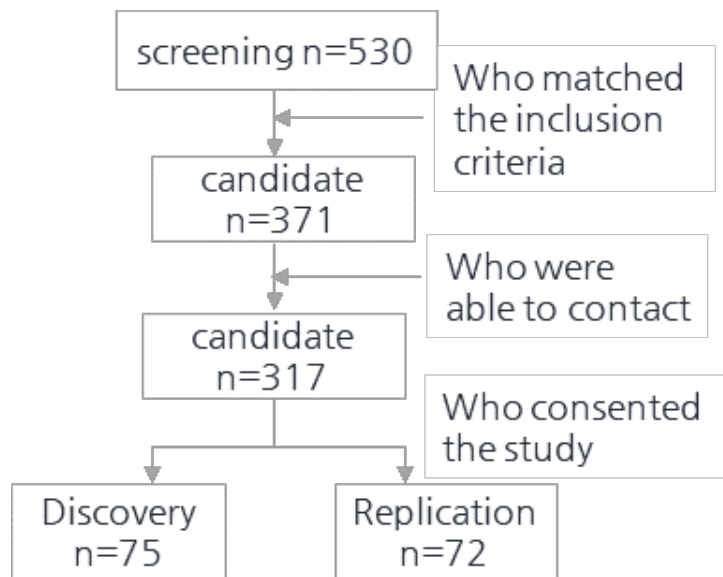


Figure 2. Patient enroll process

2.2. 면역억제제 요법

신장이식 환자들은 이식 당시 유도요법으로 수술일 날 수술전과 이식후 4일째 정맥주사 바실릭시맵(Simulect®, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, USA) 20 mg을 투여하거나 수술일부터 4-7일 동안 rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®, Sanofi, Paris, France)를 체중 당 1.5 mg 정맥주사 투여되었다. 모든 환자는 동일하게 메칠프레드니솔론(Methysol®, Alvogen Korea, Seoul, Korea) 500 mg을 수술일에 정맥주사 투여하였다. 이후 유지요법은 삼중 면역억제 요법으로 타크로리무스, 미코페놀레이트(Cellcept®, Roche, Nutley, NJ, USA; 또는 Myfortic, Novartis, East Hanover, NJ, USA), 그리고 스테로이드가 투여되었다. 타크로리무스 초기 용량은 체중 당 0.075 mg을 1일 2회 수술전 시작하여 이후 혈중농도 모니터링하여 용량 조절되었다. 이식 첫 달에는 혈중 최저 농도 10-12 ng/mL, 이후 3개월까지는 8-10 ng/mL, 이후 6개월까지는 6-8 ng/mL, 그리고 향후 4-6 ng/mL로 조절되었다. 스테로이드는 경구제인 프레드니솔론으로 바뀌 2주 내 퇴원시까지 1일 10 mg으로 점차 감량되었다. 또한, 미코페놀레이트는 모페틸 염 500 mg 또는 나트륨 염 360 mg을 1일 2회 12시간 간격으로 투여 시작하여 부작용에 따라 감량 조절되었다. 병용 약물로 타크로리무스와 상호작용 있는 것으로 보고된 약제 중 Drug Interaction Facts™, IBM Micromedex®, Lexicomp®에서 공통적으로 제시한 azole계 항진균제 등의 약물이 병용되지 않음을 확인하였다.(56-58)

2.3. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 분석

2.3.1. 타크로리무스 약동학 파라미터의 산출

타크로리무스 혈액 농도는 최저농도(trough concentration, C_0)로서 1년 치 자료가 전자의무기록(electronic medical record, EMR)으로부터 수집되었다. 타크로리무스 농도는 전혈에서 Waters 2795 Alliance HT system (Waters Ltd., Watford, UK) 및 Quattro micro API tandem mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) 기기를 이용하여 액체 크로마토그래피 - 직열 질량 분석법으로 측정되었다.(59) 또한 타크로리무스 복용 용량을 수집하여 측정된 농도를 일일 투여량에 보정하였다(tacrolimus C_0/D). 각 값은 수술후 임상적으로 불안정함에 따라 단기간인 1-3일, 4-7일, 8-14일, 15-28일로 나누고, 모니터링 기준치에 따라 1-3개월, 4-6개월, 7-12개월 기간으로 나누어 평균값을 구했다. 각 유전형 및 임상변수에 따른 선형 자료를 위해 최종 값은 로그 산출되었다(log transformed C_0/D , logC/D).

2.3.2. 임상변수 자료 수집

전자의무기록으로부터 기저 특성 정보인 수술시 나이(age), 체중(weight), 성별(sex), 공여자 정보(donor type), 면역학 및 수술정보, 기저질환, 신질환 원인 등의 정보를 수집했다. 타크로리무스와 연관된 임상변수로서 나이, 적혈구용적율(hematocrit, Hct), 총 빌리루빈(total bilirubin, Tbil), 알부민(albumin, Alb), 혈청

크레아티닌(serum creatinine, sCr), 총 콜레스테롤(total cholesterol, Tchol), 알라닌아미노전달효소(alanine transaminase, ALT)의 정보를 1년치 값을 수집하여 약동학 파라미터와 동일한 기간으로 나누어 평균값을 구했다.

2.3.3. 검체 수집 및 데옥시리보핵산 추출

모집된 환자의 혈액 검체는 에틸렌디아민사아세트산(ethylene-diaminetetraacetic acid, EDTA)으로 코팅하여 항응고 처리된 전혈로서 외래 진료 시 검사용으로 채혈된 것으로 진단검사의학과에서 잔여 혈액 검체를 수령하였다. 신장이식 환자의 혈액으로부터 유전적 데옥시리보핵산(genomic deoxyribonucleic acid, gDNA)은 QuickGene DNA whole blood kit (Kurabo Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출되었다. gDNA의 순도와 농도는 NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA)으로 측정하여 순도로서 OD260/280이 1.8 이상, OD260/230 1.5 이상을 확인하였다.

2.3.4. 차세대염기서열 분석

발굴군에서 엑손과 비해독부위(untranslated region, UTR)가 전장엑솜분석 기술을 통해 분석되었다. 해당 부위는 표적하기 위해 SureSelect Human All Exon kit V5+UTRs (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)가 사용되었다. gDNA 1 μ g을 정량하여 해당

키트로 캡처 및 증폭시켜 유전체라이브러리(genomic library)를 만들었다. 이는 High Sensitivity DNA kit를 사용하여 Bioanalyzer™ (Agilent Technologies)로 질과 양이 검정되었다. 샘플은 2개씩 Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit (200-bp read length, Thermo Fisher Scientific)에 로딩되어 Ion Proton 시퀀서로 시퀀싱되었다. 판독 결과는 human reference genome (hg19)를 기준으로 Torrent Mapping Alignment Program version 4.0.6 (Thermo Fisher Scientific)으로 매핑되었다. Torrent 서버로부터 각 시퀀싱의 판독 수, 커버리지, 변이, 동형접합(homozygote) 및 이형접합(heterozygote) 수 등의 시퀀싱 결과 유전변이 메트릭스를 평가했다. 변이 호출(variant calling)은 Torrent Variant Caller (TVC) plugin 버전 4.4.3.3으로 수행됐다. 변이는 SNVrap (<http://jjwanglab.org/snvrap>)을 통해 주석달기를 시행했다.(60)

2.3.5. 기보고된 유전형 분석

기존에 보고된 유전형을 함께 분석하기 위해, 문헌 탐색을 수행했다. Pubmed 데이터베이스에서 신장이식 환자에서 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형을 보고한 논문으로 2014년 중순까지 발표된 문헌을 스크리닝 하였다. 총 17 유전자에서 43개의 유전형이 확인되었다. 그 중 동아시아인 집단에서 MAF 1% 이상이고 SureSelect kit에서 표적되지 않는 부위를 스크리닝하여 최종 분석할 11개 유전자의 23개 유전형을 선정했다.

SureSelect kit에서 표적되지 않는 intron을 포함하는 부위를

SNaPshot™ Multiple Kit (Thermo Fisher Scientific) 또는 SNPtype™ assay (Fluidigm, San Francisco, CA, USA)로 제조사 프로토콜에 따라 분석했다. CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, NR1I2, SLC01B3, 그리고 SUMO4 유전자에서 총 10개의 유전형은 SNaPshot assay로 (Table 2), 반면에 *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *CYP3A5*, *NR1I2*, *POR*, *PPARA*, *PPARD*, 그리고 *SUMO4* 유전자에서 총 13개의 유전형을 SNPtype assay로 분석했다 (Table 3).

Table 2. The oligonucleotide primers and melting temperature (T_m) used for SNaPShot assays

Gene	Variant	T _m (°C)	Primer set
<i>CYP3A7</i>	rs2257401	55	Forward: CTTGACATGGTGGTGAATG Reverse: TAAGTTGCTGGGACTGTGA SNP primer: TCATSATGACCCAAAGTACTGGA
<i>CYP3A7</i>	rs12360	55	Forward: TGGAGCCTGATTTCCCTAAG Reverse: AATGTGCAGGAAACATCCAA SNP primer: GGTGTTCCTGGGRCACAGCTTTCTT
<i>CYP3A4</i>	rs12333983	55	Forward: GTGGGGCCTTTGTCAGAAC Reverse: GATCGGGGCACTAAGTGTGT SNP primer: GAAATTAGATTGGAATGGATGTA
<i>CYP3A4</i>	rs2242480	60	Forward: CCAGCAGAAACTGCAGG Reverse: GAGTCAGTGAAAGAATCAGTGATT SNP primer: TACCCAATAAGGTGAGTGGATG
<i>CYP3A4</i>	rs4646437	60	Forward: TTTTATCCTTCAAAAGATGCACA Reverse: TCTTTCAGGCCAGTGGCT SNP primer: GGCAGGTCTATGCATAAGGAGCACC
<i>CYP3A5</i>	rs776746	60	Forward: TTATGGAGAGTGGCATAGGA Reverse: GCTGATTAACTTCACTAGCC SNP primer: CTCTTTAAAGAGMTCTTTTGTCTTTCA
<i>CYP3A5</i>	rs15524	55	Forward: TGGATGGTGAGTGCTTTTA Reverse: AGACTCTGGGAGAGCTCAA

			SNP primer:
			GGAGAATGAGTTATTCTAAGGA
<i>ABCB1</i>	rs1045642	55	Forward: TCTTGTTTTTCAGCTGCTTG
			Reverse: AACCCAAACAGGAAGTGTG
			SNP primer:
			GGTGGTGWCACAGGAAGAGAT
<i>ABCB1</i>	rs2032582	55	Forward: CAAATCTTGGGACAGGAAT
			Reverse: GGCCTGAAAAGTGAAGAAAG
			SNP primer:
			GAAAGATAAGAAAGAACTAGAAAGGT
<i>NR1I2</i>	rs2276707	55	Forward: GTGAGGGGAGAGATGAGAG
			Reverse: CTGCAGCTTCTTCAGCAT
			SNP primer:
			GCTTGCTGAGAAGCTGCCCCCTCCAT
<i>SLCO1B3</i>	rs4149117	55	Forward: TTGAGGGAAGGTACAATGTC
			Reverse: GGTGAAGTTGTGAAGCCTTA
			SNP primer:
			TGGGAAMTGGAAGTATTTTGACA
<i>SLCO1B3</i>	rs7311358	55	Forward: CTGGATCTACCCTTGAAAT
			Reverse:
			GATTATTAATGGATTTATTTCTAC
			SNP primer:
			GATCTACATATCCAATATCCACGTA
<i>SUMO4</i>	rs237024	55	Forward: AGATCAGATTCCGATTGTTG
			Reverse:
			CAATTGAACAAGGTATGTGAGA
			SNP primer:
			TACCAGYTACTTCATGTATAATAAA

SNP, single nucleotide polymorphism

Table 3. The oligonucleotide primers for the SNPtype assay

Gene	Variant	Primers	Oligonucleotide sequence
<i>ABCB1</i>	rs1128503	Allele specific primers	TCTGCACCTTCAGGTTTCAGG CTCTGCACCTTCAGGTTTCAGA
		Locus specific primers	GCCTTGAAGTTTTTTTCTCACTCGTCC
		Specific target primers	CCACCGTCTGCCCCACT
<i>ABCC2</i>	rs2273697	Allele specific primers	ACATCAGGTTCACTGTTTCTCCAAT CATCAGGTTCACTGTTTCTCCAAC
		Locus specific primers	CCAACTTGCCAGGAAGGAGTA
		Specific target primers	CCATGAGCTTCTGGGCATC
<i>ABCC2</i>	rs2804402	Allele specific primers	ACTCCAGGCTTCAACAATCCTC ACTCCAGGCTTCAACAATCCTT
		Locus specific primers	GCTCATGCCTGCAATCCCAG
		Specific target primers	GCCCAGGCTGGTCTCAAA
<i>ABCC2</i>	rs3740066	Allele specific primers	ACCTACCTTCTCCATGCTACCA CCTACCTTCTCCATGCTACCG
		Locus specific primers	CCTGAGCTGGATCTGGTCCT
		Specific target primers	AGGCCTTCCTTCACTCCA
<i>ABCG2</i>	rs2231142	Allele specific primers	CCGAAGAGCTGCTGAGAACTT CCGAAGAGCTGCTGAGAACTG
		Locus specific primers	TGATGGGCACTCTGACGGT
		Specific target primers	CATGATTTCGTCATAGTTGTTGCAAG
<i>CYP3A5</i>	rs15524	Allele specific primers	CCTAAGTGGAGAATGAGTTATTCTAAGG AC
			CCTAAGTGGAGAATGAGTTATTCTAAGG AT

<i>NR1I2</i>	rs3814055	Locus	GGCACAGCTTTCTTGAAGACCA
		specific primers	
		Specific target	GTGGATTCAAGAGATGGAACCC
		primers	TCATTTTTTTGGCAATCCCAGGTTC
<i>NR1I2</i>	rs6785049	Allele	TCATTTTTTTGGCAATCCCAGGTTT
		specific primers	
		Locus	GGAGACCACGATTGAGCAAACA
		specific primers	
<i>NR1I2</i>	rs6785049	Specific target	ATGTTCACCTGAAGACAACTGTG
		primers	
		Allele	CCATCCTCCCTCTTCCTCTCA
		specific primers	CATCCTCCCTCTTCCTCTCG
<i>POR</i>	rs1057868	Locus	GCACCAGCAGCCATCCCATA
		specific primers	
		Specific target	AGTCATCCTCAGGGAAAGGAG
		primers	
<i>POR</i>	rs1057868	Allele	CGCCGTTCTCCCCGG
		specific primers	CGCCGTTCTCCCCGA
		Locus	
		specific primers	GGCCGCATCAACAAGGG
<i>POR</i>	rs2868177	Specific target	GAACATGGGCACCAGCG
		primers	
		Allele	GACTTTGGATCCTACACAGTGAGT
		specific primers	ACTTTGGATCCTACACAGTGAGC
<i>PPARA</i>	rs4823613	Locus	GTCTCCCTGCCTCAGCCT
		specific primers	
		Specific target	AGCCCTGGATCCTGTGG
		primers	
<i>PPARA</i>	rs4823613	Allele	ATCCATTAAAAGCCACATTTAACCCTAA
		specific primers	ATCCATTAAAAGCCACATTTAACCCTAG
		Locus	
		specific primers	TGCCCCGGCCTGCTTT-TAATTT
<i>PPARD</i>	rs2267668	Specific target	TGCATACTAGCCTTGTGGTCTA
		primers	
		Allele	TGAGTTTGAGCTGTCTGGTAAAATATCTA
		specific	GAGTTTGAGCTGTCTGGTAAAATATCTG

		primers	
		Locus	
		specific	GCATCTGTGGGACCC-CAAC
		primers	
		Specific	
		target	AAAATGATGGGTTCTGTTTGGATAGA
		primers	
<i>SUMO4</i>	rs237025	Allele	CAAATCGGAATCTGATCTGCTTCAC
		specific	CAAATCGGAATCTGATCTGCTTCAT
		primers	
		Locus	
		specific	TGTGAACCACGGGGA-TTGTCA
		primers	
		Specific	
		target	TTGTCTGTTCCACTGATTGGTTG
		primers	

2.3.6. 생물정보학 분석

본 연구에서 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형은 전장엑솜분석 결과와 기존에 알려진 유전형을 포함하여 분석하기 위해 변이 결과를 통합하여 생물정보학 분석을 수행했다. 형질 종류에 따라 참고서열인 hg19와 동일할 경우 0, 이형접합체는 1, 동형변형접합체 (homovariant)는 2로 코딩하여 유전형 부가모델(additive model)로 약동학 파라미터에 대해 각 기간별로 선형 회귀 분산 분석을 수행했다. 다중검정을 보정하기 위해 Benjamini-Hochberg 방법 (또는 false discovery rate, FDR)으로 보정하여 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 결정했다. 유전형 중 MAF가 1% 미만인 개별 유전형은 제외했다. 기간별 영향이 유사한 유전형이 의미있는 것으로 가정하면 각 값이 반복측정임을 고려한 선형회귀모형의 유전형 단변량 분석을 통해 최종 유의한 유전형을 도출했다.

하디-바인베르크 평형(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 검정은 관측된 유전형과 기대되는 유전형의 빈도를 카이제곱 검정으로 분석하였고 p 값이 0.001을 넘는 경우 적합하지 않은 것으로 판단했다.

2.3.7. 시퀀싱 변이 호출 검증

전장엑솜 분석의 변이 호출의 정확성을 검증하기 위해 Sanger 시퀀싱 분석이 수행되었다. 후보 유전형 중 *CYP3A7* rs2257401 서열에 대해 전체 검체를 분석하였다. 변이 부위는 중합연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 프라이머로 증폭되었다(Table 4).

정제된 PCR 앰프리콘은 제조사의 프로토콜에 따라 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 시퀀싱되었다. 이후 분석은 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 통해 시행되었다.

2.3.8. 연관 분석

동일 염색체에서 확인된 유전형은 연관불균형 (linkage disequilibrium)의 관계로 서로 하나의 유전형에 따라서 함께 확인되었을 가능성이 있으므로 연관 분석(linkage analysis)를 수행하였다. Haploview software (v4.2, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA)를 통해 이배체형(haplotype)을 확인했다. 기본 설정값인 신뢰구간법(Confidence intervals, Gabriel *et al*)으로 연관 블록을 분석하였다. 연관불균형 값 r^2 는 1이 완전 상관된(complete linkage) 것으로 0.6 - 0.8인 경우 상관관계가 높은 것으로 판단했다. 각 이배체형(diplotype)의 빈도와 이배체형에 따른 타크로리무스 약동학의 영향을 검정하기 위해 선형 회귀 분산 분석을 수행하였다.

Table 4. The oligonucleotide primers used for Sanger sequencing

Gene	Variants	RefSeq id	Location	Primer set
<i>CYP3A7</i>	rs2257401	NG_007983.1	g.31137C>G	Forward: ATGATACTGTGC Reverse: CTGTGACTGGCTATAG
RefSeq, reference sequences				

2.4. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 검증

2.4.1. 유전형 분석 및 자료 수집

전장엑솜분석에서 도출된 유전형을 검증하기 위해 재현군에서 분석되었다. CYP3A 군으로 *CYP3A4* rs12333983, rs4646437, rs2242480, *CYP3A5*로서 rs15524와 rs776746, 그리고 *CYP3A7*으로 rs12360, rs10211과 rs2257401이 SNaPshot assay로 분석되었다. 타크로리무스 혈중 농도 자료와 임상 자료는 발현군과 동일하게 전자의무기록으로부터 수집되었다.

2.4.2. 통계 분석

약동학 지표는 동일하게 타크로리무스 혈중 최저농도를 전날 1일 투여한 용량으로 보정하여 로그화하였다. 기간별로 분류한 평균값을 분석한 유전형 종류에 따라 선형회귀 분산분석을 수행했고, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. *CYP3A7* rs2257401의 역할을 규명하고자 기존에 가장 효과크기가 큰 것으로 알려진 유전형 *CYP3A5* rs776746에 따라 *CYP3A5* 발현군과 비발현군으로 분류하여 rs2257401 유전 변이에 따른 분산 분석을 수행하였다.

2.5. 선형혼합모형 분석

2.5.1. 기본 모형

선형혼합모형으로 변수를 설명하기 위해서는 반복측정된 값이 연관된 것으로 해석가능해야 하며 모형의 잔차 분포가 굴곡없이 고루 확인되어야 선형 모형을 활용하는 것이 적합하다. 본 데이터로 선형혼합모형을 추정하는 것이 적절한지 데이터 분포를 확인하였다. 선형혼합모형에서 임의효과는 기본적으로 개인간 차이가 포함된다. 그 외 타크로리무스 농도는 기간별로 목표 값이 다르므로 이를 임의효과로 함께 추정하여 적합성을 평가하였다.

2.5.2. 임상변수 모형 및 유전형 모형

임상변수를 보정한 모형을 구축하기 위해 각 임상변수인 age, Hct, Tchol, Alb, Tbil, sCr, 그리고 ALT와 타크로리무스 지표와의 상관관계 분포를 확인하였다. 임상변수는 측정된 값 또는 정상범위 기준에 따라 군을 분류하여 분석했다. (Hct 33 % 이상, Tchol 200 mg/dL 이하, Alb 3.3 g/dL 이상, Tbil 1.2 mg/dL 이하, sCr 1.4 mg/dL 이하, ALT 40 U/L 이하) 최종 임상변수 선형혼합모형은 후진제거법(Backward Elimination)으로 선정하고 변수의 효과가 상관관계 분포 및 임상적 해석과 적합한지 확인하였다. 유전형 모형은 본 생물정보학 분석에서 도출된 유전형 개별 변이와 기준에 보고된 *CYP3A5* 발현군/비발현군에 따른 기준, 그리고 임상변수로 보정한 유전형 모형이 모두 분석되었다.

가장 적합한 모형 선정을 위해 AIC, BIC, 및 log-likelihood 값이 비교되었다. 값이 유사한 경우 모형 간 차이는 카이제곱 검정을 수행하여 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하게 차이가 있는 것으로 해석하였다.

2.6. 기타 통계 분석

기저 인구학적 정보로 발굴군과 재현군의 차이는 범주형 변수(categorical variable)와 연속형 변수(continuous variable)에 대해 각각 카이제곱 검정 및 Fisher의 정확 검정, 그리고 스튜던트 t 검정을 수행하여 양측검정에서 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 통계 분석은 R 프로그램(version 3.3.4. www.r-project.org) 및 IBM SPSS Statistics 프로그램 23.0 패키지(International Business Machines Co., NY, USA)를 사용하였다.

Chapter 3. Results

3.1. 인구학적 특성

기저 인구학적 특성은 다음 Table 5와 같다. 모집된 발굴군과 재현군 간에는 나이(46.2 ± 13.0 vs 48.0 ± 12.4 , $p = 0.386$), 체중(60.8 ± 11.8 vs. 60.3 ± 9.3 kg, $p = 0.778$), 성별(남성 비율 61.3% vs. 66.7%, $p = 0.759$)의 기본 정보를 포함하여 말기신부전 원인질환 및 생화학적 임상 변수 값에 유의한 차이가 보이지 않았다. 타크로리무스 약동학에 의미 있게 영향을 미치는 병용약물 항진균제 등은 모집 환자에서 복용되지 않은 것이 확인됐다.

Table 5. Baseline demographic characteristics for included subjects

	Discovery patients (N= 75)	Replication patients (N= 72)	P value
Age (years)	46.2 \pm 13.0	48.0 \pm 12.4	0.386
Male, N (%)	46 (61.3)	48 (66.7)	0.759
Body weight (kg)	60.8 \pm 11.8	60.3 \pm 9.3	0.778
Deceased donor, N (%)	44 (58.7)	41 (53.9)	0.354
Origin of kidney disease, N (%)			
Diabetes	19 (25.3)	13 (18.1)	0.112
Hypertension	6 (8.0)	10 (13.9)	0.147
Glomerulonephritis	26 (34.7)	26 (36.1)	0.603
PKD	7 (9.3)	7 (9.7)	0.512
Others	7 (9.3)	4 (5.6)	0.544
Unknown/CGN	10 (13.3)	12 (16.7)	0.470
Clinical variables			
Hematocrit (%)	34.8 \pm 3.9	33.9 \pm 3.6	0.114
Total cholesterol (mg/dL)	151.8 \pm 36.1	152.3 \pm 40.2	0.928
Albumin (g/dL)	3.5 \pm 0.5	3.5 \pm 0.6	0.995
Total bilirubin (mg/dL)	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4	0.913
Alanine transaminase (U/L)	15.2 \pm 10.2	16.3 \pm 10.3	0.494

3.2. 시퀀싱 분석 결과

본 분석방법으로 74,569,526의 판독이 표적되었고, 분석결과 검체별로 중앙값 48,194,415(31,278,758 - 93,723,614)의 판독 수가 나왔다. 평균 커버리지 depth는 57.78x(41.09 - 105.5)였고, 커버리지가 20x를 넘는 판독은 평균 87.87%(77.87 - 96.09)였다 (Table 6). 변이 호출 결과 총 293,531 변이가 확인되었고, 본 변이가 생물정보학 분석에 이용되었다. 동형접합 변이는 중앙값 256,321 (253,001-258,746)개, 이형접합 변이는 37,211(34,785-40,530) 개 확인되었다. 그 외 분석 결과는 Table 6에 제시되었다.

Table 6. Summary of exome sequencing quality and exome variant metrics (N = 75)

Quality measure	Median (range)
Total reads (N)	6489589247 (4430895977–10858208267)
Base in target reads (N)	74569526
Number of mapped reads (N)	48194415 (31278758–93723614)
Percent base in target reads (%)	66.78 (47.69–72.28)
Average base coverage depth (x)	57.78 (41.09–105.5)
Uniformity of base coverage per target (%)	95.14 (94.38–95.8)
Captured regions with coverage > 20 (%)	87.87 (77.87–96.09)
Mean coverage of target region (x)	75.38 (53.11–79.74)
Homozygous variants (N)	256321 (253001–258746)
Heterozygous variants (N)	37211 (34785–40530)

3.3. 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형의 분석

발굴군에서 연구기간 이식 후 1년 동안에 총 2,900개의 타크로리무스 C₀ 농도가 수집되었다. 개인별 중앙값 37(28 - 94)개 수집되었다. 타크로리무스 농도 측정값이 많은 환자는 1년 이내 거부반응, 감염 또는 불분명한 신기능 악화 등의 원인에 의해 입원한 환자였다. 분산분석과 단변량 선형혼합모형을 통해 확인된 유전형은 3번 염색체에 *NR1I2*와 7번 염색체의 *PTCD1*, *CPSF4*, *ZNF789*, *ZKSCAN5*, *FAM200A*, *ZSCAN25*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, 그리고 *CYP3A4* 가 확인되었다(Figure 3). 확인된 유전형의 변이 호출을 위한 매핑이 정확한지 확인하기 위해 정렬(alignment) 결과를 데이터베이스 서열과 비교하여 확인했다(Figure 4). 모든 변이는 하디-바인베르크 평형에 부합했고 동아시아 유전형 빈도와 비교되었다(Table 7). 16개 유전형은 FDR 보정 이후 p 값 0.05 미만으로 1년내의 각 시점에 타크로리무스 logC/D와 유의하게 연관되었다(Figure 5, Table 8). *CYP3A7*의 rs2257401 C>G 대체가 전기간 가장 유의한 변이로 확인되었고 이는 타크로리무스 지표값을 증가시켰다. 이는 이식후 3일째에도 강하게 영향을 미치는 유일한 유전형이었다($p = 1.74 \times 10^{-7} \sim p = 0.0138$, Figure 6, Table 8). 다른 14개 유전형은 이식후 7일부터 1년째까지 여러 시점에서 타크로리무스와의 연관성이 확인되었다(*CPSF1* rs883403, rs1043466; *ZNF789* rs6962772; *FAM200A* rs10238965; *ZSCAN25* rs1859690, rs3735453; *CYP3A5* rs15524, rs776746; *CYP3A7* rs10211, rs12360, rs2257401; *CYP3A4* rs12333983, rs2242480; 그리고 *NR1I2* rs3814055). 약물 대사 효소와 연관된

유전자 *CYP3A4*, *CYP3A5*과 *CYP3A7* 그리고 핵 수용체 유전자인 NR1I2에 대한 유전형 총 7개의 각 기간별 유전변이의 타크로리무스 logC/D 값은 Table 9에 제시되었다.

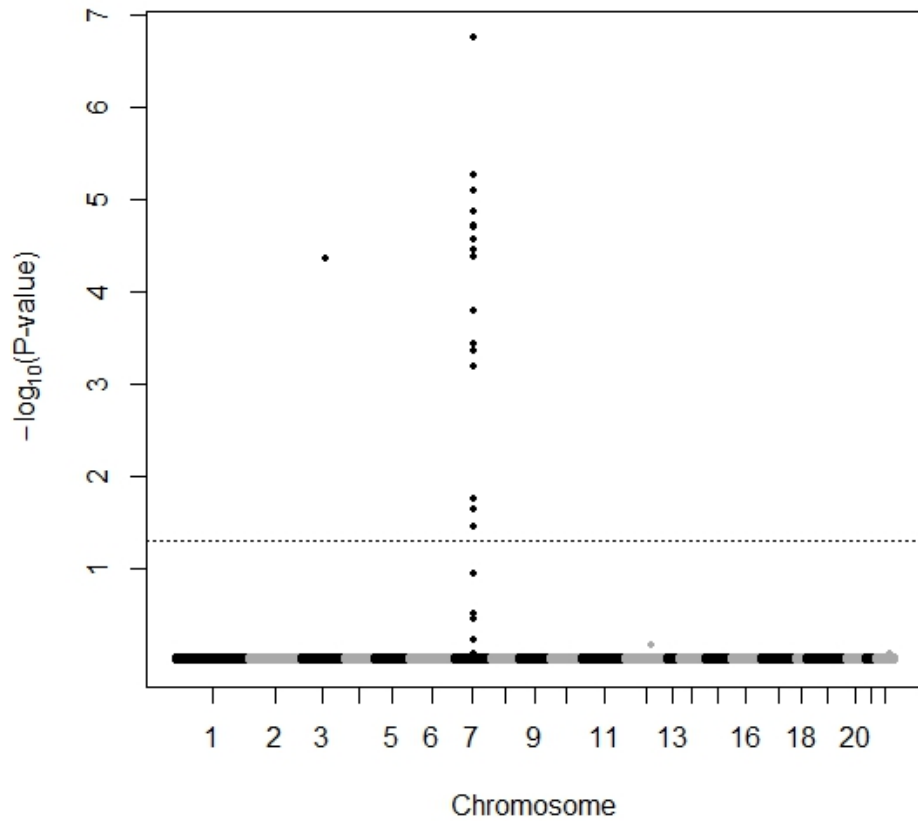


Figure 3. Manhattan plots of variants associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations on day 7 after transplantation. The dotted horizontal line shows the cutoff for $p = 0.05$ after the false discovery rate correction.

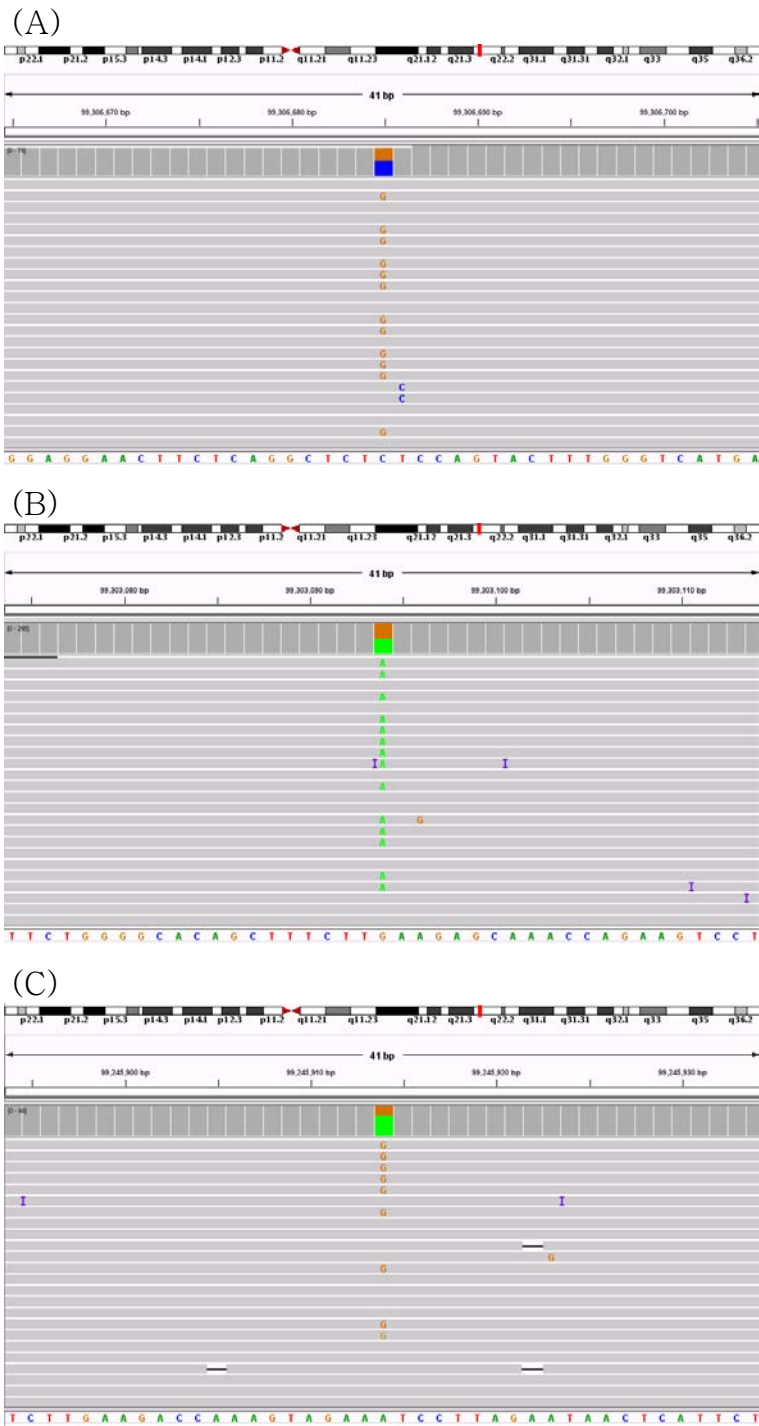


Figure 4. Alignment of exome sequences showing (A) CYP3A7 rs2257401 variant, (B) CYP3A7 rs12360 variant, and (C) CYP3A5 rs15524 variant by Integrative Genomics Viewers

Table 7. Allele frequencies of variants associated with daily dose-adjusted tacrolimus trough levels in the discovery set

SNP	Position	Allele	Gene	Consequence	MAF	HWE p value
rs28495024	Chr7	G>C	PTCD1	3' UTR	0.300	0.034
rs883403	Chr7	A>G	CPSF4	Synonymous	0.313	0.228
rs1043466	Chr7	T>G	CPSF4	3' UTR	0.273	0.020
rs6962772	Chr7	A>G	ZNF789	5' UTR	0.313	0.228
rs3137	Chr7	C>T	ZKSCAN5	3' UTR	0.280	0.119
rs10238965	Chr7	C>T	FAM200A	Synonymous	0.313	0.228
rs1859690	Chr7	T>C	ZSCAN25	Synonymous	0.213	0.230
rs3735453	Chr7	A>G	ZSCAN25	3' UTR	0.273	0.245
rs15524	Chr7	C>T	CYP3A5	3' UTR	0.293	0.230
rs776746	Chr7	A>G	CYP3A5	Intron	0.273	0.245
rs10211	Chr7	G>A	CYP3A7	3' UTR	0.267	0.181
rs12360	Chr7	C>T	CYP3A7	3' UTR	0.267	0.181
rs2257401	Chr7	C>G	CYP3A7	missense	0.307	0.397
rs12333983	Chr7	A>T	CYP3A4	3' UTR	0.260	0.358
rs2242480	Chr7	T>C	CYP3A4	Intron	0.207	0.863
rs3814055	Chr3	T>C	NR1I2	5' UTR	0.233	0.737

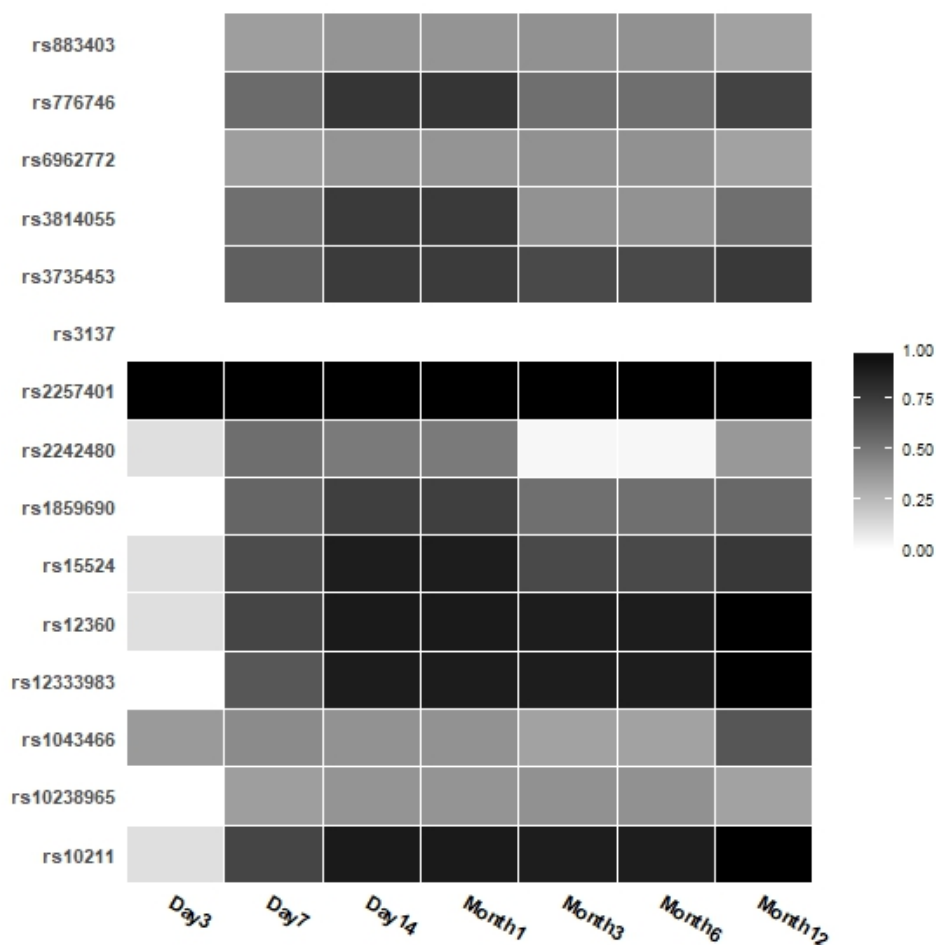


Figure 5. Heat map plots of variants commonly associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations from day 3 to 1 year after transplantation. The color was rescaled on the basis of adjusted P value of variants associated with dose adjusted tacrolimus trough concentrations (black, high significant association; white, low significant association).

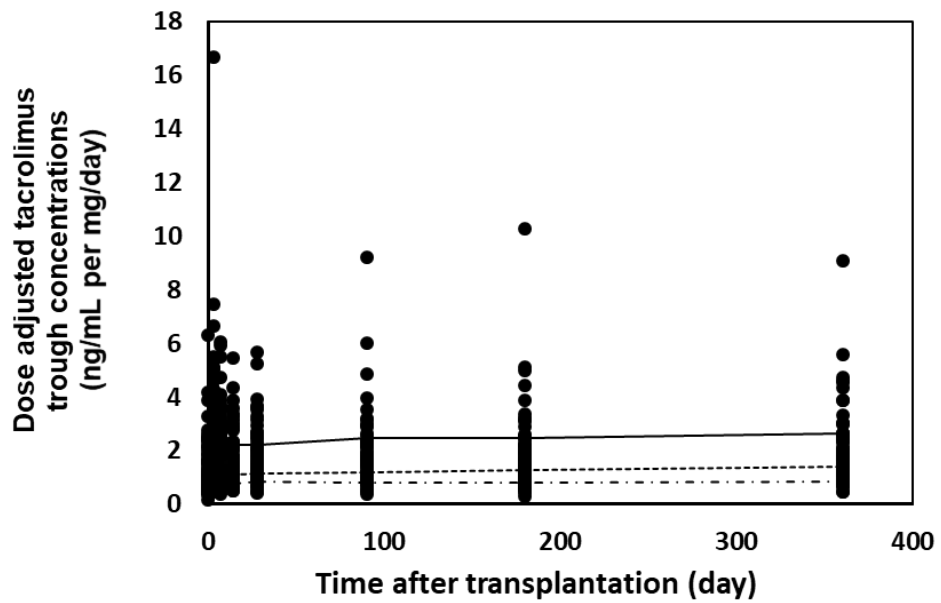


Figure 6. Dose adjusted tacrolimus trough concentrations in patients after kidney transplantation. Solid, dotted, dashed lines indicated the mean of dose adjusted tacrolimus trough concentrations in CYP3A7 rs2257401 GG carriers, CYP3A7 rs2257401 CG carriers, and CYP3A7 rs2257401 CC carriers, respectively

Table 8. Association of variants with daily dose-adjusted tacrolimus trough levels by the analysis of variance of linear regression in the discovery set (N=75)*

Variants	Day 3	Day 7	Day 14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
rs28495024	1.38×10^{-01}	6.51×10^{-04}	5.42×10^{-02}	5.42×10^{-02}	7.18×10^{-04}	9.26×10^{-04}	9.26×10^{-04}
rs883403	1.38×10^{-01}	3.73×10^{-04}	1.03×10^{-03}	1.03×10^{-03}	3.37×10^{-04}	3.37×10^{-04}	4.93×10^{-02}
rs1043466	5.96×10^{-02}	1.58×10^{-04}	9.23×10^{-04}	9.23×10^{-04}	5.97×10^{-04}	5.97×10^{-04}	8.25×10^{-03}
rs6962772	1.38×10^{-01}	3.73×10^{-04}	1.03×10^{-03}	1.03×10^{-03}	3.37×10^{-04}	3.37×10^{-04}	4.93×10^{-02}
rs3137	1.38×10^{-01}	2.26×10^{-02}	1.28×10^{-01}	1.28×10^{-01}	1.18×10^{-02}	1.18×10^{-02}	3.56×10^{-01}
rs10238965	1.38×10^{-01}	3.73×10^{-04}	1.03×10^{-03}	1.03×10^{-03}	3.37×10^{-04}	3.37×10^{-04}	4.93×10^{-02}
rs1859690	1.38×10^{-01}	2.72×10^{-05}	1.39×10^{-05}	1.39×10^{-05}	1.03×10^{-04}	1.03×10^{-04}	1.29×10^{-02}
rs3735453	1.38×10^{-01}	1.99×10^{-05}	1.07×10^{-05}	1.07×10^{-05}	2.48×10^{-05}	2.48×10^{-05}	3.94×10^{-03}
rs15524	1.07×10^{-01}	7.94×10^{-06}	1.87×10^{-06}	1.87×10^{-06}	2.48×10^{-05}	2.48×10^{-05}	3.84×10^{-03}
rs776746	1.38×10^{-01}	3.51×10^{-05}	7.79×10^{-06}	7.79×10^{-06}	1.03×10^{-04}	1.03×10^{-04}	5.01×10^{-03}
rs10211	1.07×10^{-01}	5.46×10^{-06}	1.55×10^{-06}	1.55×10^{-06}	4.08×10^{-06}	4.08×10^{-06}	9.43×10^{-04}
rs12360	1.07×10^{-01}	5.46×10^{-06}	1.55×10^{-06}	1.55×10^{-06}	4.08×10^{-06}	4.08×10^{-06}	9.43×10^{-04}
rs2257401	1.38×10^{-02}	1.74×10^{-07}	4.90×10^{-07}	4.90×10^{-07}	1.53×10^{-06}	1.53×10^{-06}	9.39×10^{-04}
rs12333983	1.38×10^{-01}	1.34×10^{-05}	1.77×10^{-06}	1.77×10^{-06}	4.08×10^{-06}	4.08×10^{-06}	9.43×10^{-04}
rs2242480	1.07×10^{-01}	4.14×10^{-05}	2.94×10^{-04}	2.94×10^{-04}	9.18×10^{-03}	9.18×10^{-03}	3.87×10^{-02}
rs3814055	1.38×10^{-01}	4.37×10^{-05}	1.02×10^{-05}	1.02×10^{-05}	3.42×10^{-04}	3.42×10^{-04}	1.51×10^{-02}

*P value was adjusted by a false discovery rate correction.

Table 9. Tacrolimus trough levels over time according to genotypes in the discovery set (N=75)

SNP (Gene)	Allele	N	Daily dose adjusted tacrolimus trough levels (ng/mL per mg/day)						
			Day 3	Day 7	Day 14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
rs15524 (CYP3A5)	TT	40	3.24±2.68	2.59±1.37*	2.13±1.04*	2.06±1.05*	2.26±1.41*	2.31±1.61*	2.43±1.54*
	CT	26	1.99±1.12	1.48±0.93	1.19±0.49	1.35±0.89	1.40±1.06	1.39±0.89	1.64±0.99
	CC	9	1.08±0.47	0.74±0.39	0.76±0.25	0.86±0.40	0.80±0.25	0.78±0.26	0.83±0.28
rs776746 (CYP3A5)	GG	42	3.19±2.62	2.53±1.30*	2.09±1.02*	2.04±1.04*	2.26±1.38*	2.31±1.58*	2.47±1.54*
	AG	25	1.94±1.20	1.40±0.94	1.16±0.49	1.32±0.91	1.32±1.05	1.30±0.84	1.49±0.81
	AA	8	1.11±0.49	0.74±0.42	0.73±0.25	0.85±0.42	0.78±0.26	0.78±0.28	0.84±0.30
rs10211 (CYP3A7)	AA	43	3.21±2.59	2.58±1.33*	2.11±1.02*	2.11±0.13*	2.35±1.48*	2.37±1.61*	2.51±1.56*
	GA	24	1.84±1.12	1.26±0.65	1.09±0.35	1.15±0.39	1.13±0.41	1.15±0.34	1.36±0.51
	GG	8	1.11±0.49	0.74±0.42	0.73±0.25	0.85±0.42	0.78±0.26	0.78±0.28	0.84±0.30
rs2257401 (CYP3A7)	GG	38	3.47±2.65*	2.77±1.30*	2.23±1.02*	2.23±1.16*	2.48±1.52*	2.45±1.70*	2.63±1.60*
	CG	28	1.76±1.07	1.25±0.61	1.11±0.34	1.17±0.37	1.18±0.40	1.26±0.44	1.42±0.58
	CC	9	1.15±0.48	0.78±0.40	0.78±0.29	0.87±0.40	0.79±0.24	0.81±0.28	0.86±0.29
rs12333983 (CYP3A4)	TT	43	3.17±2.60	2.57±1.32*	2.12±1.02*	2.08±1.11*	2.35±1.48*	2.38±1.61*	2.52±1.55*
	AT	25	1.92±1.15	1.27±0.73	1.07±0.34	1.20±0.60	1.11±0.39	1.12±0.34	1.32±0.50
	AA	7	1.02±0.45	0.75±0.45	0.73±0.26	0.84±0.46	0.77±0.28	0.80±0.29	0.84±0.33
rs2242480 (CYP3A4)	CC	47	3.14±2.53	2.46±1.30*	2.02±1.02*	1.98±1.11*	2.21±1.48*	2.24±1.60*	2.42±1.53
	CT	25	1.66±0.91	1.19±0.82	1.02±0.35	1.21±0.63	1.12±0.46	1.10±0.41	1.24±0.50

	TT	3	0.78±0.20	0.58±0.18	0.69±0.20	0.69±0.27	0.79±0.38	0.89±0.42	0.89±0.41
rs3814055	CC	45	2.79±2.59	2.10±1.34*	1.65±1.00*	1.72±1.14*	1.90±1.50*	1.96±1.64*	2.14±1.58
(<i>NR1I2</i>)	CT	25	2.19±1.49	1.81±1.31	1.65±1.00	1.59±0.90	1.59±1.02	1.58±0.99	1.74±1.02
	TT	5	2.20±1.21	1.52±0.81	1.52±0.68	1.61±0.65	1.81±0.70	1.65±0.59	1.56±0.68

Data are presented as mean with standard deviation. *P value < 0.05 by ANOVA of linear regression adjusted based on the FDR correction

3.4. 타크로리무스 약동학과 일배체형의 상관관계

7번 염색체에서 유전형이 다수 확인되어 일배체형 및 LD 분석이 시행되었다. 7개 유전자 *CPSF1*, *ZNF789*, *FAM200A*, *ZSCAN25*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, 그리고 *CYP3A4*에서 확인된 13개 유전형에 대해 분석한 결과, 두 개의 일배체형 블록이 형성되었다(Figure 7). 하나는 *CPSF1* rs883403과 rs1043466, *ZNF789* rs6962772, *FAM200A* rs10238965, 그리고 *ZSCAN25* rs1859690이었고, 다른 블록은 *ZSCAN25* rs3735453, *CYP3A5* rs15524과 rs776746, *CYP3A7* rs10211, rs12360과 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983로 구성되었다. 그 중 *ZNF789* rs6962772과 *FAM200A* rs10238965, 그리고 *CYP3A7* rs10211과 rs12360의 서열이 완전 연관 되었다. 이에 *ZNF789* rs6962772과 *CYP3A7* rs12360은 이후 분석에 고려되지 않았다. *CYP3A7* rs2257401과 *CYP3A5* rs776746 간의 높은 상관관계를 보였다($r^2 = 0.79$). *CYP3A4* rs2242480과 *CYP3A5* rs776746는 중등도의 상관관계를 보였다($r^2 = 0.50$). *CYP3A* 군의 유전형 *CYP3A5* rs15524와 rs776746, *CYP3A7* rs10211와 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983에 대해 CAGCA-CAGCA와 TGAGT-TGAGT를 포함한 이배체형 빈도를 분석한 결과는 Table 10와 같다. 이배체형 CAGCA-CAGCA와 TGAGT-TGAGT는 각 9.3%와 45.3%로 확인됐다. 이배체형 TGAGT-TGAGT는 CAGCA-CAGCA에 비해 타크로리무스 약동학 지표 값 증가와 전기간에 강하게 연관되었다(Table 11).

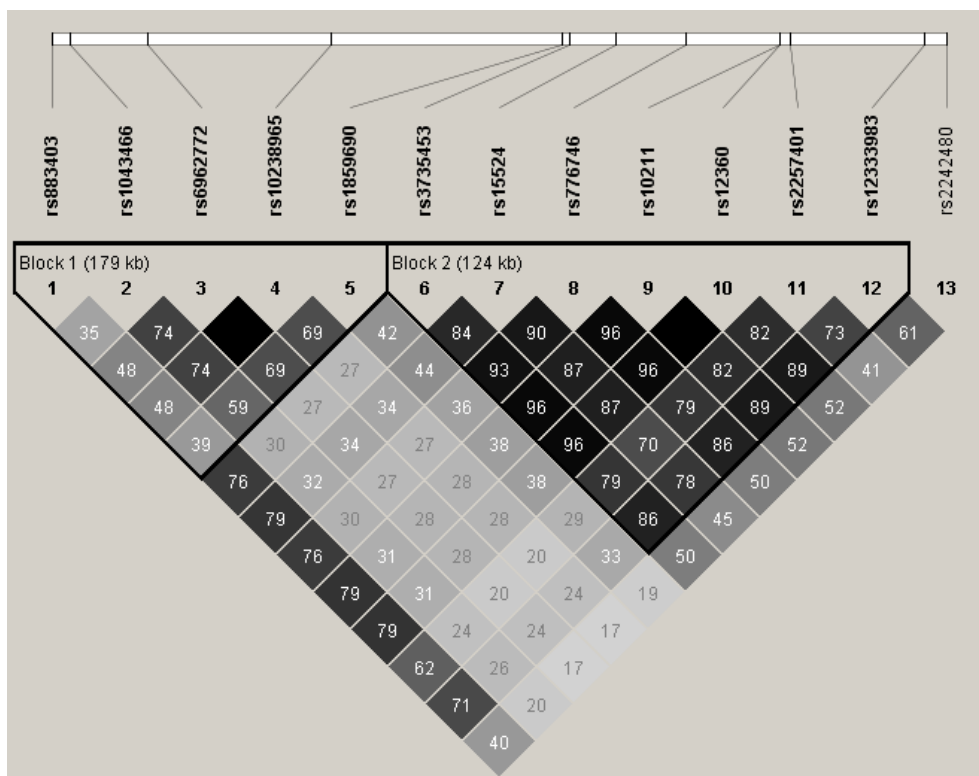


Figure 7. Haplotype plots of variants on chromosome 7 commonly associated with tacrolimus trough concentrations from day 7 to 1 year after transplantation

Table 10. Diplotype frequencies of CYP3A5 rs15524 and rs776746, CYP3A7 rs10211 and rs2257401, and CYP3A4 rs123339839 in the discovery set (N=75)

Group	Diplotype	N	Frequency (%)
TGAGT – TGAGT	TGAGT–TGAGT	34	45.3
TGAGT – CAGCA	TGAGT–CGAGT	21	28.0
CAGCA – CAGCA	AGCA–AGCA	7	9.3
Other	TGAGT–TGACT	5	6.7
	TGAGT–CGAGT	2	2.7
	TGAGT–TAAGT	1	1.3
	TGAGT–TGAGA	1	1.3
	TGAGT–CAGCT	1	1.3
	TGACT–CAGCA	1	1.3
	CAGCA–CAGCT	1	1.3
	CGAGT–CAGCA	1	1.3

Table 11. Tacrolimus trough levels over time according to haplotypes of CYP3A5 rs15524 and rs776746, CYP3A7 rs10211 and rs2257401, and CYP3A4 rs123339839 in the discovery set (N=75)

Diplotype	N	Daily dose adjusted tacrolimus trough levels (ng/mL per mg/day)						
		Day 3	Day 7	Day 14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
TGAGT – TGAGT	34	3.50±2.79*	2.73±1.32*	2.29±1.05*	2.14±1.06*	2.55±1.12*	2.42±1.47*	2.43±1.71*
Others	34	1.92±1.11	1.44±0.92	1.18±0.45	1.37±0.88	1.39±0.61	1.37±0.94	1.40±0.82
CAGCA – CAGCA	7	1.02±0.45*	0.75±0.45*	0.73±0.26*	0.84±0.46*	0.77±0.28*	0.80±0.29*	0.84±0.33*

Data are presented as mean with standard deviation. **P*value<0 by ANOVA of linear regression.

3.5. 재현군에서 타크로리무스 약동학에 대한 유전형의 영향 검증

재현군에서 연구기간 이식 후 1년 동안에 총 2,940개의 타크로리무스 C_0 농도가 수집되었다. 개인별 중앙값 34(27 - 77)개 수집되었다. 발굴군에서 확인된 유전형 중 CYP3A 군 해당 유전형 7개 *CYP3A5* rs15524과 rs776746, *CYP3A7* rs10211, rs12360와 rs2257401, 그리고 *CYP3A4* rs12333983과 rs2242480이 분석되었고 재현군에서의 빈도는 발굴군과 유사하였다(Table 12). 각 기간별 유전형에 대한 타크로리무스 logC/D 값은 Table 13에 제시되었다.

Table 12. Allele frequencies of CYP3A5, CYP3A4, and CYP3A7 in the replication set (N=72)

Gene	Variants	Genotype	Frequency ^a , N (%)	MAF (%)	HWE P value
<i>CYP3A5</i>	rs15524	CC	6 (8.3)	29.2	0.865
		CT	30 (41.7)		
		TT	36 (50.0)		
	rs776746	AA	6 (8.3)	27.8	0.939
		AG	28 (38.9)		
		GG	38 (52.8)		
<i>CYP3A7</i>	rs10211	GG	6 (8.3)	27.8	0.939
		AG	28 (38.9)		
		AA	38 (52.8)		
	rs12360	CC	6 (8.3)	27.8	0.939
		CT	28 (38.9)		
		TT	38 (52.8)		
	rs2257401	CC	6 (8.3)	29.9	0.944
		CG	31 (44.4)		
		GG	35 (47.2)		
<i>CYP3A4</i>	rs12333983	AA	5 (6.9)	29.2	0.674
		AT	32 (44.4)		
		TT	35 (48.6)		
	rs2242480	TT	5 (6.9)	27.1	0.916
		CT	29 (40.3)		
		CC	38 (52.8)		

^aFrequency is given as the number of patients, with the percentage of patient cohort given in parenthesis. MAF, minor allele frequency; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium

Table 13. Tacrolimus trough levels over time according to genotypes in the replication set (N=72)

SNP (Gene)	Allele	N	Daily dose adjusted tacrolimus trough levels (ng/mL per mg/day)						
			Day 3	Day 7	Day 14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
rs15524 (CYP3A5)	TT	36	3.49±1.88	2.72±1.57	2.31±1.20	2.59±1.07	2.26±0.86	2.20±0.77	2.39±0.87
	CT	29	1.58±1.19	1.24±0.73	1.07±0.56	1.17±0.58	1.18±0.74	1.15±0.76	1.32±1.02
	CC	6	0.74±0.34	0.60±0.25	0.67±0.22	0.68±0.22	0.76±0.35	0.62±0.16	0.75±0.17
rs776746 (CYP3A5)	GG	38	3.38±1.8	2.68±1.54	2.30±1.20	2.56±1.07	2.28±0.95	2.22±0.89	2.45±1.08
	AG	28	1.57±1.89	1.16±0.68	0.98±0.41	1.10±0.47	1.06±0.38	1.02±0.31	1.14±0.39
	AA	6	0.73±0.34	0.60±0.25	0.67±0.22	0.68±0.22	0.76±0.35	0.62±1.60	0.75±0.17
rs12360 (CYP3A7)	TT	38	3.38±1.89	2.68±1.54	2.30±1.20	2.56±1.07	2.28±0.95	2.22±0.89	2.45±1.08
	CT	28	1.57±1.19	1.16±0.68	0.98±0.41	1.10±0.47	1.06±0.38	1.02±0.31	1.14±0.39
	CC	4	0.85±0.36	0.71±0.19	0.72±0.19	0.76±0.18	0.83±0.31	0.68±0.11	0.75±0.19
rs2257401 (CYP3A7)	GG	35	3.34±1.91	2.63±1.57	1.23±2.20	2.48±1.09	2.20±0.98	2.15±0.92	2.32±1.09
	CG	31	1.78±1.40	1.36±0.95	1.21±0.78	1.33±0.82	1.27±0.69	1.23±0.64	1.43±0.84
	CC	6	0.74±0.34	0.60±0.25	0.67±0.22	0.68±0.22	0.76±0.35	0.62±0.16	0.75±0.17
rs12333983 (CYP3A4)	TT	36	3.25±2.01	2.62±1.63	2.22±1.27	2.48±1.17	2.20±1.02	2.16±0.97	2.31±1.16
	AT	32	1.75±1.31	1.29±0.79	1.11±0.61	1.24±0.64	1.21±0.59	1.14±0.50	1.35±0.71
	AA	4	0.87±0.35	0.61±0.13	0.75±0.18	0.76±0.18	0.86±0.32	0.70±0.09	0.86±0.04
rs2242480 (CYP3A4)	CC	38	3.23±1.95	2.56±1.62	2.12±1.27	2.39±1.18	2.07±0.93	2.06±0.84	2.20±0.91
	CT	29	1.67±1.34	1.19±0.73	1.10±0.58	1.21±0.62	1.20±0.63	1.13±0.55	1.30±0.76

TT	3	0.83±0.52	0.54±0.29	0.68±0.32	0.70±0.34	0.77±0.47	0.62±0.25	0.78±0.14
----	---	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Data are presented as mean with standard deviation. *P value < 0.05 by ANOVA of linear regression adjusted based on the FDR correction

3.6. CYP3A5 발현군에서의 CYP3A7 rs2257401의 효과

발굴군의 유전형 분석 결과에서 *CYP3A7* rs2257401이 가장 유의한 것으로 분석되었으나 이는 기존에 주요하게 알려진 *CYP3A5* rs776746과 연관불균형 관계에 있으므로 이에 의해 확인된 것으로 보일 수 있다. 이에 *CYP3A7* rs2257401 유전형의 역할을 분석하기 위해 *CYP3A5* 발현군(*CYP3A5**1/*1 또는 *CYP3A5**1/*3)과 비발현군(*CYP3A5**3/*3) 각각에서 *CYP3A7* rs2257401 유전 변이가 영향이 있는지 분석했다. *CYP3A5* 발현군에서 *CYP3A7* rs2257401 유전형에 따라 타크로리무스 logC/D에 유의한 차이를 나타냈다($p < 0.001$). 그러나 *CYP3A5* 비발현군에서는 *CYP3A7* rs2257401 유전형에 유의한 차이가 나타나지 않았다($p = 0.180$, Table 14). *CYP3A5* 비발현군에서는 *CYP3A7* CC 유전형이 확인되지 않았다.

Table 14. Tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in CYP3A7 rs2257401 genotypes classified by different patients expressing CYP3A5

CYP3A5	rs2257401	N	Daily dose adjusted tacrolimus trough concentrations (ng/mL per mg/day)						
			Day 3	Day 7	Day 14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
Expressers*	GG or CG	52	1.61±0.99	1.23±0.75	1.05±0.43	1.15±0.69	1.20±0.78	1.17±0.65	1.33±0.66
	CC	15	0.99±0.46	0.70±0.35	0.74±0.26	0.82±0.35	0.78±0.28	0.74±0.25	0.82±0.25
Non-	GG	71	3.26±2.29	2.58±1.39	2.17±1.09	2.09±0.97	2.25±1.23	2.18±1.33	2.37±1.36
expressers	CG	9	2.11±1.61	1.80±1.23	1.83±1.05	2.04±1.29	1.84±0.92	2.00±0.87	2.16±1.29

Data are presented as mean with standard deviation. *P<0.05 analyzed by a mixed effect model after adjusted by patient age, serum albumin, and creatinine. CYP3A5 expressers are carriers with CYP3A5*1/*1 or CYP3A5*1/*3

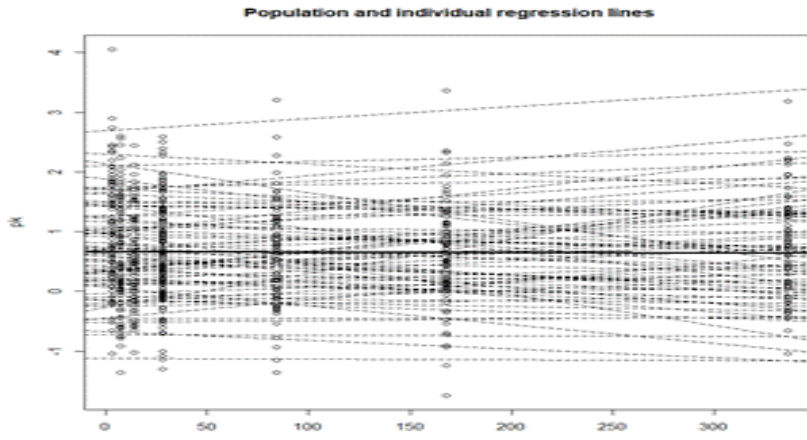
3.7. 기본 모형

본 분석에서는 유전형 탐색에서 사용된 타크로리무스 약동학 지표인 $\log C/D$ 를 동일하게 1년 이내 기간별 평균값에 대해 선형혼합모형 탐색에 사용했다. 타크로리무스 약동학 값을 각 측정 시간별 분포를 분석한 결과 개인별 차이를 보였으나 유사한 선형성을 지니는 것이 보여 선형혼합모형을 적용할 수 있음을 확인했다(Figure 8). 임의효과 모형에서 개인 이외에 타크로리무스 표적 농도를 포함한 경우 개인효과만 포함한 것보다 모형이 더 적합했다(AIC 966.22 vs 958.93; BIC 979.41 vs 976.51; log likelihood -480.11 vs -475.46, p value = 0.0023).

3.8. 임상변수 선형혼합모형의 구축

연구 기간 1년 동안의 임상변수로서 Hct, Tbil, Alb, sCr, Tchol, ALT의 발굴균과 재현균 기간별 측정 평균값은 Table 15와 같다. 각 임상변수 별 약동학 지표에 대한 분포를 확인했다(Figure 9). 임상변수로 보정된 선형혼합모형은 후진제거법으로 선택했다. 최종 age, Hct, Alb, sCr이 포함되었다. 임상변수를 연속형 변수인 측정값으로 대입한 것과 범주형 변수인 정상범위 내외의 분류로 분석한 모형을 비교했을 때 연속형 변수가 더 적절한 것으로 확인되었다(AIC 882.0696 vs 900.0818; BIC 917.2051 vs 935.2572; log likelihood -433.0148 vs -442.0409). 변수별 효과추정 값은 그림 양상과 유사하여 최종 임상변수 모형으로 선택했다(Table 16).

(A)



(B)

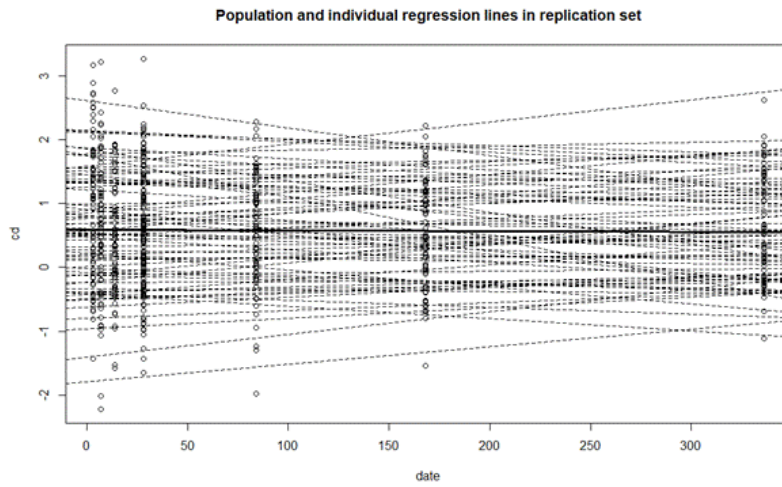


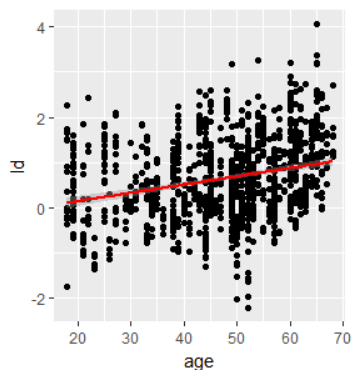
Figure 8. Distributions of log transformed dose-adjusted tacrolimus concentrations in (A) Discovery group and (B) Replication group at each time point

Table 15. Blood biochemistry data of patients at different time points after transplantation

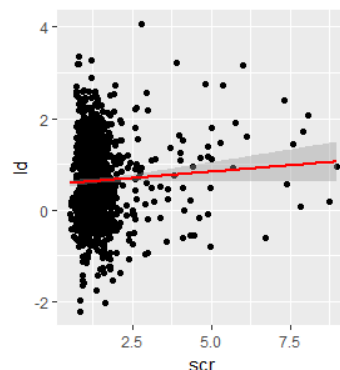
Variables	Day 3	Day 7	Day14	Month 1	Month 3	Month 6	Month 12
Discovery group							
Hematocrit (%)	31.9±3.9	32.1±4.3	32.3±3.9	35.0±4.2	36.3±4.0	38.9±4.1	40.4±4.4
Total cholesterol (mg/dL)	152.8±30.2	165.7±33.6	164.4±26.4	187.6±35.4	177.4±32.4	176.3±31.7	179.4±28.6
Serum albumin (g/dL)	3.5±0.3	3.5±0.4	3.6±0.4	4.0±0.4	4.3±0.3	4.4±0.3	4.4±0.3
Total bilirubin (mg/dL)	0.5±0.1	0.6±0.2	0.6±0.2	0.6±0.3	0.6±0.2	0.6±0.2	0.7±0.2
Serum creatinine (mg/dL)	3.3±2.1	1.6±1.1	1.3±0.7	1.3±0.7	1.4±0.5	1.3±0.4	1.3±0.5
Alanine transaminase (U/L)	13.3±9.2	24.1±24.7	35.7±42.0	29.4±24.5	20.4±12.8	18.3±10.8	19.7±12.8
Replication group							
Hematocrit (%)	31.6±3.4	31.8±3.9	32.0±3.7	33.8±3.5	36.1±3.9	39.2±4.2	41.1±4.7
Total cholesterol (mg/dL)	148.5±30.7	163.6±29.6	164.2±35.9	188.9±39.3	182.3±31.5	178.9±31.9	181.5±27.8
Serum albumin (g/dL)	3.4±0.3	3.5±0.4	3.5±0.3	4.0±0.4	4.2±0.3	4.3±0.3	4.3±0.3
Total bilirubin (mg/dL)	0.6±0.4	0.6±0.2	0.6±0.3	0.6±0.3	0.6±0.3	0.7±0.3	0.8±0.3
Serum creatinine (mg/dL)	3.5±2.2	1.8±1.5	1.4±1.1	1.3±0.4	1.3±0.3	1.3±0.3	1.3±0.3
Alanine transaminase (U/L)	11.4±4.8	29.1±24.1	38.6±49.4	28.8±24.9	21.1±12.4	20.6±15.1	20.0±11.1

Data are presented as mean with standard deviation.

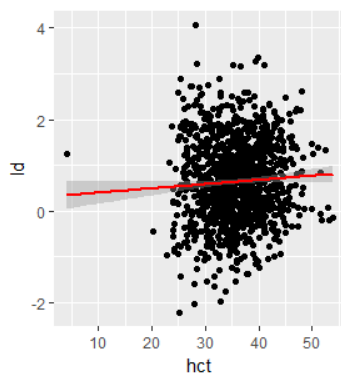
(A) patients age



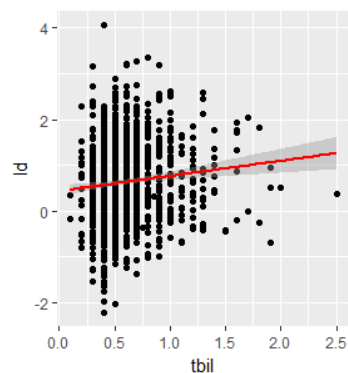
(D) serum creatinine



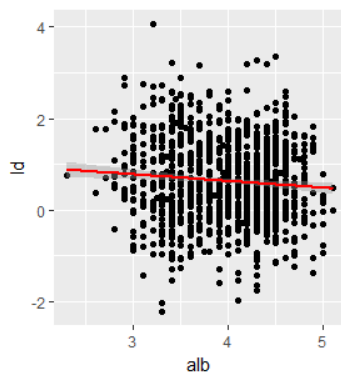
(B) serum hematocrit



(E) total bilirubin



(C) serum albumin



(F) alanine transferase

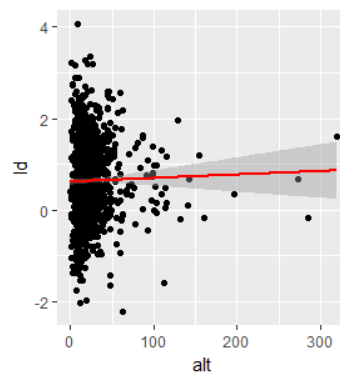


Figure 9. Relationship between clinical variables and tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in all data set

Table 16. Linear mixed model with clinical variables for log transformed tacrolimus dose-adjusted trough concentrations

	Estimate	95% CI
(Intercept)	-1.275	-1.994, -0.557
Age	0.026	0.014, 0.039
Hematocrit	0.032	0.021, 0.044
Creatinine	0.124	0.088, 0.159
Albumin	-0.160	-0.267, -0.053

3.9. 최종 선형혼합모형

최종 선형혼합모형을 분석하기 위해 유전형만 포함한 모형과 임상변수를 포함한 모형이 분석되었다(Table 17). 기존 가이드라인에 제시된 CYP3A5 발현군 및 비발현군으로 분류한 것보다 CYP3A7 rs2257401의 변이를 사용하는 것이 발골군에서 더 좋았다. 재현군에서는 두 모형 2와 3이 차이를 보이지 않았다. 각각 단독적으로 유전형만, 임상변수만을 포함하는 것보다 혼합한 모형이 더 적합한 것으로 확인됐다. 임상변수를 보정한 모형에서 rs2257401을 사용하는 것이 발골군에서 더 적합했다. 재현군에서는 rs776746을 사용하는 것이 적합한 것으로 보였으나 통계적인 차이를 보이지 않았다. Rs2257401과 rs776746 유전형을 사용하는 것이 각각 유사한 효과를 나타내는 것으로 보였으므로 각 모형을 전체 데이터에 대입하여 잔차를 분석한 결과 rs2257401을 사용한 모형5의 잔차가 고루 분포 되어 있었으나, rs776746을 사용한 모형 6은 잔차가 곡선 형태를 보여 본 데이터에서 부적절할 수 있음을 시사했다(Figure 10). 본 데이터로 table 18의 모형이 제안되었다.

Table 17. Results of the final linear mixed model for tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients

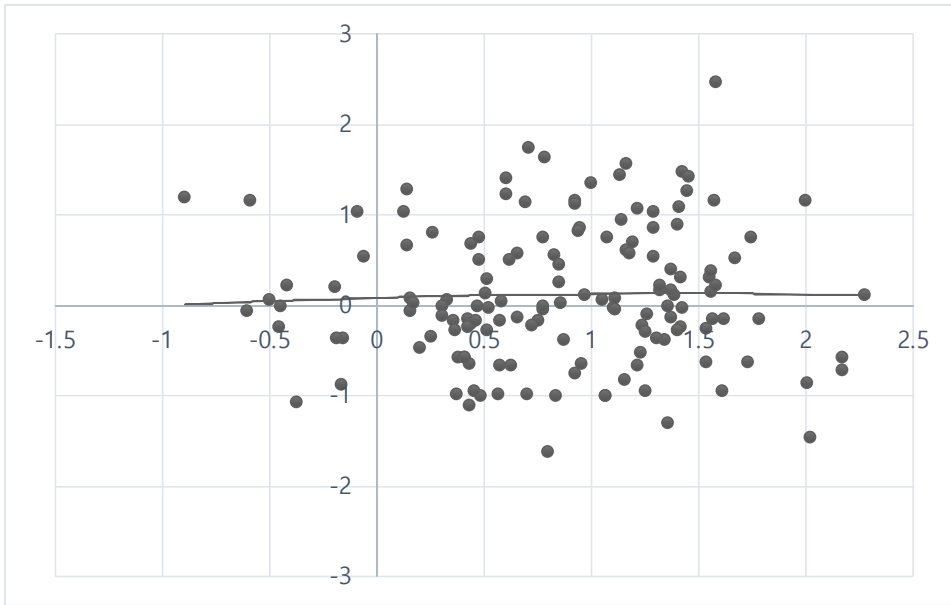
	LMM	Variation of logC/D	AIC	BIC	logLik
Discovery	<i>Base model</i>				
set	1: Simple time trend model	0.7315	958.9256	976.5133	−475.4628
	2: CYP3A5 expression	0.5746	927.4357	949.4204	−458.7179
	3: rs2257401	0.4790	905.0985	931.4801	−446.5492
	<i>Model with clinical variables</i>				
	4: Clinical Variables	0.6738	882.0296	917.2051	−433.0148
	5: C + rs2257401 ^a	0.4167	819.8344	859.4067	−400.9172
	6: C + rs776746 ^b	0.4847	839.2719	878.8443	−410.636
Replication	<i>Base model</i>				
set	1: Simple time trend model	0.7836	822.2771	839.4433	−407.1385
	2: CYP3A5 expression	0.4792	762.7806	784.2384	−376.3903
	3: rs2257401	0.4814	763.3588	784.8166	−376.6794

	<i>Model with clinical variables</i>				
	4: Clinical Variables	0.7576	772.0932	806.6594	−378.0466
	5: C + rs2257401 ^a	0.4454	705.4409	744.3278	−343.7204
	6: C + rs776746 ^b	0.4225	699.0206	737.9076	−340.5103 ^d
Combined	<i>Base model</i>				
set	1: Simple time trend model	0.7623	1805.089	1825.299	−898.5443
	2: CYP3A5 expression	0.5492	1718.919	1744.182	−854.4594
	3: rs2257401	0.5029	1695.99	1721.254	−842.9951
	<i>Model with clinical variables</i>				
	4: Clinical Variables	0.7204	1651.826	1692.248	−817.913
	5: C + rs2257401 ^a	0.4415	1524.531	1570.005	−753.2653
	6: C + rs776746 ^b	0.4684	1539.513	1584.987	−760.7564

C: clinical variables adjusted with age, hematocrit, albumin included, LMM: linear mixed effect models

^a LMM constructed with rs2257401 variants, ^b LMM constructed with rs776746 variants, ^c non-significance of chi square test with LMM C+rs2257401 in replication set(model 5 vs model 6)

(A)



(B)

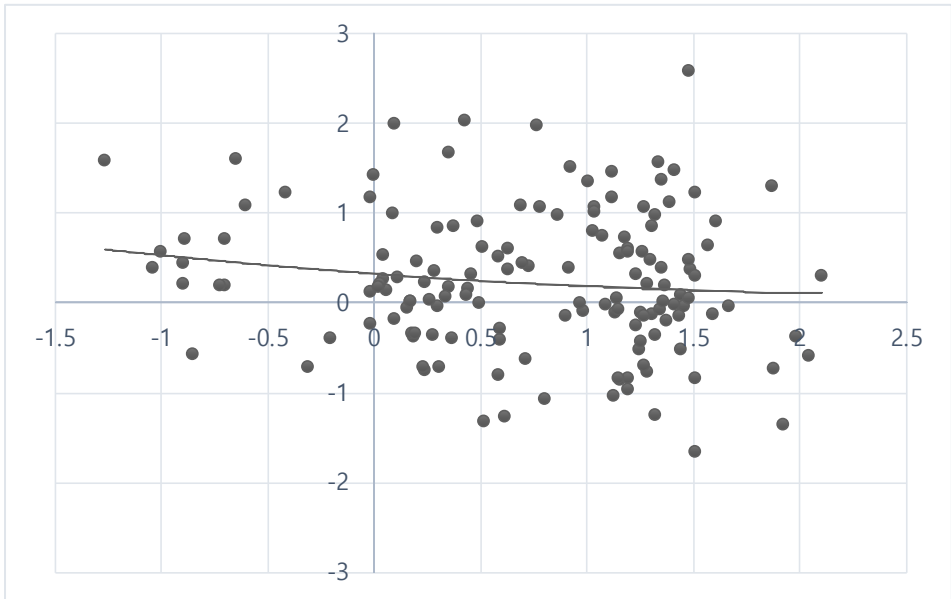


Figure 10. Residual plot for each LMM (A) model 5 and (B) model 6 in day 3

Table 18. Final linear mixed effect model with rs2257401 adjusted with clinical variables

	Estimate	95% CI
(Intercept)	-2.837	-3.332, -2.341
Age	0.018	0.012, 0.024
Hematocrit	0.030	0.023, 0.038
Creatinine	0.111	0.088, 0.134
Albumin	-0.187	-0.261, -0.112
rs2257401	0.862	0.744, 0.980

Chapter 4. Discussion

본 연구에서 전장 엑손과 비해독부위, 그리고 알려진 인트론 영역에서 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형 바이오마커를 종합적으로 신장이식 환자에서 탐색함으로써, *CYP3A7* 유전자 내 새로운 유전형을 확인하고 *CYP3A* 군 내 SNP의 영향을 검증할 수 있었다. 본 연구는 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형을 탐색하기 위해 전장엑솜분석 기술을 이용한 최초의 연구이며, 유전형 바이오마커 외 다른 영향인자를 포함하여 타크로리무스 약동학을 설명하기 위해 선형회귀모형이 분석되었다. *CYP3A7* rs2257401이 전기간 타크로리무스 약동학 지표와 가장 유의하게 영향을 미치는 것이 확인되었다. 본 유전형과 더불어 환자 나이, 알부민, 적혈구용적률, 크레아티닌의 임상변수를 보정하면 타크로리무스 약동학 차이를 설명하기에 용이했다.

CYP3A7 효소는 태아 간에서 주요한 CYP 효소이다. 그러나, 출생 이후 1년 이내 이의 발현이 급격히 감소하는 것으로 보고되었다.(61) Sim *et al.*에서는 성인 간에서 *CYP3A7* 단백질 발현이 *CYP3A5* 발현보다 10% 더 높아 다양한 기질의 대사에 영향을 받을 것으로 보고되었다.(62) *CYP3A7*은 17.1kb 길이의 크로모솜 7q22.1에 위치한 유전자로 13 부위의 엑손을 포함한다. 기저 기전은 *CYP3A7*의 엑손에 위치한 rs2257401 C-G 대체에 의한 것으로 추정된다. 이 유전변이는 Thr/Arg으로의 아미노산 대체를 유발하고, *in vitro* 사람 HEK293 세포에서 효소 활성 감소를 일으켰다.(63) 그러나, 일부 연구들에서는 *CYP3A7* 효소의 역할에 대해 회의적이다. *CYP3A7*의 재조합

슈퍼숨에서는 CYP3A4와 CYP3A5에 비해 대사 활성이 낮았다.(64) Baculovirus가 발현하는 CYP 효소에서 타크로리무스에 대한 CYP3A7의 대사 속도는 CYP3A5보다 낮으나, 타크로리무스에 대한 친화력(Michaelis value, K_m)이 CYP3A5보다 높았다.(30)

칼시뉴린 저해제에 대해 소수의 연구에서는 프로모터 위치의 변이인 *CYP3A7*1C*이 대사에 영향을 것이 보고되었으나 결론이 도출되지는 않았다.(65-67) *CYP3A7*1C* 대립유전자를 지니는 경우 성인에서 유전자 발현이 높아 시클로스포린의 용량이 더 높게 요구되었다.(65, 66) 그럼에도 불구하고, Elens *et al.*에서는 본 유전적 다형성이 간이식 환자의 타크로리무스 C_0/D 나 용량 요구와 관련이 없는 것으로 보고되었다.(67) *CYP3A7* rs2257401은 한국인 중 건강한 사람에서 농도 곡선하 면적과 연관된 것으로 확인되었다.(31)

CYP3A7 rs2257401 대립유전자의 빈도는 인종에 따라 상당한 차이가 보고되었다. Rs2257401 C 대립유전자의 MAF는 각 인종 Tanzanian (MAF = 0.62), Chinese (MAF = 0.28), Saudi Arabian (MAF = 0.17), 그리고 Caucasian (MAF = 0.08) 집단에서 차이를 보였다.(63) 본 연구에서의 *CYP3A7* rs2257401 유전형 MAF는 30.7%로 기존의 한국인 건강한 사람의 빈도와 유사하였다.(65-68) *CYP3A7* rs2257401 변이는 아시아인 후손에 더 많은 것으로 보고되었으며, 이는 본 연구 결과로 한국인 신장 이식 환자 대상 타크로리무스 C_0/D 와 가장 크게 영향을 미치는 유전형으로 확인된 것처럼 아시아인에서 유용한 바이오마커로 활용될 수 있음을 시사한다. *CYP3A7* rs12360과 rs10211은 3' -UTR에 위치한 100bp 거리의 두 SNP이다. 소수의 microRNA가 rs12360과 결합하여 유전자 발현은

조절하는 것으로 확인되었다.(69)

선형혼합모형에서, 타크로리무스 약동학과 연관된 유전형과 임상 변수가 공변량으로 선택되었다. 개별로 타크로리무스 C_0/D 와 연관된 것으로 모두 확인되었으나 최종 모델에서는 하나의 유전형을 포함하는 것이 가장 적절한 것으로 분석되었다. 선형혼합모형 중 모형 5번과 6번의 비교에서 발굴군에서는 *CYP3A7* rs2257401이 포함되었으나 재현군에서는 *CYP3A5* rs776746과 차이를 보이지 못한 부분은 재현군에서 *CYP3A5* rs776746의 변이가 더 많이 나타나 이의 효과가 더 잘 반영된 것으로 해석된다. 두 유전형의 빈도 차이는 연관성이 매우 높으나 완전히 일치하지는 않는다는 기존 보고와 유사하다.(31, 70) 따라서 본 유전형의 차이를 더 명확하게 보기 위해서는 더 큰 표본수의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 *CYP3A7* rs2257401과 *CYP3A5* rs776746이 높은 연관불균형 관계임을 보였는데($r^2 = 0.79$), 이는 Birdwell KA *et al.* 연구 보도와 유사하다. 연관불균형 관계로서 rs2257401이 타크로리무스 약동학에 영향을 미치는 것이 보고되었으나 정확한 효과 크기는 제시되지 않았다.(71) 따라서 본 연구에서는 *CYP3A7* 유전형의 온전한 역할을 분석하기 위해 *CYP3A5*의 발현 여부에 따라 군을 나누어 *CYP3A7* 변이를 분석하였고, *CYP3A5* 발현군에서도 유의한 차이를 나타냈으므로 이는 *CYP3A7*이 연관불균형 관계에 의한 것 외에도 단독으로 대사 기능을 가질 것으로 예상된다.

본 연구의 발굴군에서는, *CYP3A4*1G* (rs2242480, 20239T>C) 변이가 타크로리무스 C_0/D 를 증가시키는 것으로 보고되었는데, 이는 기존 연구 결과와 유사하다.(31) The *CYP3A4* rs2242480 SNP은

인트론 10에 위치한 유전형으로 아시아인 신장이식 환자의 타크로리무스 C₀/D와 연관된 것을 보고된 바 있으나 기능에 대해서는 정확히 알려지지 않았다.(72, 73) *CYP3A4*1B* (rs2740574, A>G)는 타크로리무스 C₀/D와 연관된 것으로 보고되었으나,(74) dbSNP 데이터베이스에서 아시아인 후손에서 변이가 보고되지 않아 본 연구에서 분석되지 않았다.(75)

기존 여러 연구들이 *ABCB1* 유전형 1236C>T (rs1128503), 2677G>A/T (rs2032582), 그리고 3435C>T (rs1045642)과 타크로리무스 약동학의 상관관계를 분석했으나, 이를 도출한 연구는 적다.(76, 77) 본 연구에서 *ABCB1* 유전형과 타크로리무스 C₀/D와 연관이 없었으나 이는 Hesselink *et al.* 와 동일하다.(74) 비록 p-glycoprotein에 의해 타크로리무스 흡수가 영향을 받는 것이 알려져 있지만, *ABCB1* 유전형의 역할은 불분명한 것으로 생각된다.

차세대염기서열분석 기술이 지속적으로 발전했으나 여전히 해결되지 않은 점이 있다. 다양한 연구들이 상호 플랫폼과 생물정보학 분석툴을 비교했으나 결론이 나온 상황은 아니다.(78, 79) 본 연구 자료에서 평균 커버리지가 55x 이상이나 약 13%의 엑솜 부위가 커버리지 20x에 도달하지 못했다. 이는 엑솜 부위를 완전히 해석하지 못하는 단점을 지닌다. 이전에 보고된 전장엑솜 시퀀싱 결과가 유사함이 확인되었으나 기술의 개선이 필요함은 부인할 수 없다.(80, 81)

본 연구에서 유의한 유전형을 선택함에 있어, 참고서열 대비 대립유전자의 서열 변이에 따라 0, 1, 2로 코딩한 부가모델을 사용했다. 전장엑솜분석을 통해 확인된 유전형은 두 개 이상의 염기가 있을 수 있고, 이의 변이가 영향이 있을 수 있으나 해당 고려사항을 반영하지

못한 제한점이 있다. 또한 삽입 및 결손에 대한 연관 유전변이가 확인될 수 있어 향후 분석이 요구된다.

기존에 유전형 연구에서는 단일 염기서열 분석을 위한 표본수를 산출하는 방법이 사용됐다. 차세대염기서열분석의 검정력을 판단하는 통계적 분석방법과 특히 질병의 진단이 아닌 약물 농도와 같은 연속형 변수에 대한 산출법을 아직 확립되지 않았다.(82) 따라서 본 연구에서는 가장 많이 사용되는 Genome Power Calculator 를 이용하여 적절한 표본 수를 추정했다.(54) *Post hoc*으로 도출된 *CYP3A7* rs2257401 유전형에 대한 검정력은 95% 이상인 것으로 확인되었으나, 여전히 저빈도 유전형에 대한 검정력은 매우 낮다. 본 연구는 임상적으로 실용적인 유전형을 탐색하기 위해 분석을 수행했으므로 방법에 제시한 MAF 0.25를 대상으로 산출한 방법이 적합한 것으로 판단했다. 본 산출 환자수를 이용하여 유의한 유전형을 분석했을 때 목표한 효과 크기와 빈도수와 유사한 유전형들이 도출되었으므로 본 계산법이 향후 다른 NGS에서도 적절하게 사용될 수 있을 것을 고려된다. 또한, MAF를 줄일수록 요구 표본수가 기하급수적으로 증가하므로 전반적인 환자대상으로 스크리닝한 본 연구 디자인 보다는 약물 혈중 농도가 튀는 환자군을 대상으로 분석을 수행하는 것이 비용효율적인 것으로 고려된다. 본 연구에서 돌연변이를 확인하기에 적합한 환자수를 모집하지 않았으므로 빈도가 1% 미만으로 확인된 유전형은 시퀀싱 오류로 판단되어 확인된 유전형에서 제외되었다.

비로 본 연구에서 유전형과 타크로리무스 약물 농도와의 관계를 분명히 밝혔으나 몇가지 제한점을 지닌다. *CYP3A7* 유전자의 여러 유전형이 확인되었으나 *CYP3A7* 효소의 약물 대사에 대한 생리학적인

역할에 대해서는 향후 더 규명되어야 한다. 그리고 전향적 연구를 통해 본 유전형 분석 결과와 같이 *CYP3A7*의 변이의 타크로리무스 약동학에 대한 효과 크기가 검증되어야 한다.

그 외 후향적으로 자료를 수집한 연구로서의 제한점을 지니고 있다. 타크로리무스 혈중 최저 농도가 .약물 AUC와 대응되는 기반 근거자료에 의해 본 자료만 수집되었으나, 연구에서 수집된 환자들이 모두 표준 농도 곡선을 나타낼지는 알 수 없다. 또한, 입원중 및 외래에서 반복적으로 혈중농도 모니터링을 위해 약물 복용 직전에 채혈하여 최저 농도를 확인하도록 교육했으나, 이의 순응도에 대해 알 수 없어 혈중 최저 농도 값이 부정확할 수 있다. 측정 오류의 영향을 최소화하기 위해 각 기간별 측정값의 평균값을 사용했다. 그러나 이를 통해 오류를 완전히 배제할 수 없으므로 전향적 연구로 환자를 통제하여 수집된 자료를 통해 유전형의 영향을 더 정확하게 판단할 수 있다.

본 연구에서 타크로리무스 약동학 지표인 타크로리무스 $\log C/D$ 에 대한 분포와 최종 모델을 적용한 잔차에 대한 분포를 확인함으로써 선형혼합모형을 사용하는 것이 적합한 것을 확인했다. 그러나, 제시한 모형으로도 타크로리무스 약동학을 완벽하게 설명하지 못하는 제한이 있다. 모집된 환자 174명 중 도중 거부반응, 감염, 칼시뉴린 억제제 독성 등에 의해 입원을 하여 타크로리무스 용량을 변경하거나 스테로이드 펄스 요법을 받은 사람들이 있다. 본 연구에서 각 값의 평균값을 사용함으로써 이의 상호작용에 대한 효과가 완화되었을 수 있으나, 설명되지 못한 부분에 영향을 미쳤을 수 있다. 일반적으로 타크로리무스 약물농도를 설명하기 위해 비선형혼합모형이 자주 사용된다. 비선형혼합모형은 각 시기별로 병용약물을 세부적으로

평가하기에 더 용이하다. 따라서, 타크로리무스 혈중 최저농도를 예측하기 위한 더 정밀한 모형으로 향후 연구해 볼 필요가 있다.

4.1. 결론

결론적으로, 본 연구는 타크로리무스의 약동학에 영향을 미치는 지표를 도출하기 위해 차세대염기서열분석 기술을 활용하여 유전체를 분석하고 기존에 보고된 유전형과 임상변수의 영향을 종합적으로 평가함으로써 타크로리무스 약물 농도 예측 모형을 제안했다. 개별 유전형으로 *NR1I2* rs3814055와 *CYP3A* 군의 rs12360, rs10211, rs2257401, rs15524, rs776746, rs12333983, rs2242480이 확인되었고, 그 중 한국인 특이적으로 타크로리무스 농도에 강력하게 영향을 미치는 유전형 *CYP3A7* rs2257401을 도출했다. 또한, 본 *CYP3A7* rs2257401 유전형을 사용하여 타크로리무스 약동학을 설명하는 선형혼합모형이 도출되었다. 본 연구 결과는 향후 타크로리무스의 개인 맞춤 용량용법을 제시함에 있어 *CYP3A7* rs2257401 유전형을 고려하는 기반 자료를 마련함으로써 타크로리무스 표적 약물 농도를 맞추는 데 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Rosselli D, Rueda JD, Diaz CE. Cost-effectiveness of kidney transplantation compared with chronic dialysis in end-stage renal disease. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2015;26(4):733-8.
2. 전경옥. 말기신부전 환자의 삶의 질 측정을 통한 신이식과 혈액투석 치료방법의 경제성 평가. J Korean Soc Transplant. 2015;29:200-8.
3. 질병관리본부. 장기이식 통계연보. 2017
4. Lopez-Medrano F, Carratala J, Cruzado JM, Gutierrez MJ, Aguado JM. Fever in a kidney transplant recipient: no facts and many interactions. Revista clinica espanola. 2012;212(4):193-7.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2009;9 Suppl 3:S1-155.
6. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, Uhl S, Tuteja S, Kaczmarek JL, et al. Calcineurin Inhibitor Minimization, Conversion, Withdrawal, and Avoidance Strategies in Renal Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Transplant. 2016;16(7):2117-38.
7. Yeung S, Tsang WK, Tong KL, Wong SH, Lee W, Tang HL, et al. Primary immunosuppression with tacrolimus and low-dose mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. Transplant Proc. 2004;36(7):2084-6.

8. Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J, et al. Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;111(4):217–23.
9. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Robinson A, et al. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2018;18 Suppl 1:18–113.
10. Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 1995;17(6):596–601.
11. Bottiger Y, Brattstrom C, Tyden G, Sawe J, Groth CG. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients. *Br J Pharmacol*. 1999;48(3):445–8.
12. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int*. 2000;13(5):313–26.
13. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):481–508.
14. Staats C, Taylor P, Tett S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(9):1905–9.
15. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc*. 1999;31(1–2):296–8.

16. Wiegel JJ, Olyaei AJ. The role of the pharmacist in the management of kidney transplant recipients. *Indian J Urol.* 2016;32(3):192–8.
17. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29(6):404–30.
18. Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest.* 1993;92(2):1018–24.
19. Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel HM, Ernst L, et al. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver–graft recipients. *Clin Chem.* 1992;38(10):2025–32.
20. Undre NA, Schafer A. Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. *European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. Transplant Proc.* 1998;30(4):1261–3.
21. Pou L, Brunet M, Andres I, Rodamilans M, Lopez R, Corbella J. Influence of posttransplant time on dose and concentration of tacrolimus in liver transplant patients. *Transpl Int.* 1998;11 Suppl 1:S270–1.
22. Gruber SA, Hewitt JM, Sorenson AL, Barber DL, Bowers L, Rynders G, et al. Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients awaiting renal transplantation. *J Clin*

Pharmacol. 1994;34(8):859–64.

23. Hebert MF, Zheng S, Hays K, Shen DD, Davis CL, Umans JG, et al. Interpreting tacrolimus concentrations during pregnancy and postpartum. *Transplantation*. 2013;95(7):908–15.

24. Zhang HJ, Li DY, Zhu HJ, Fang Y, Liu TS. Tacrolimus population pharmacokinetics according to CYP3A5 genotype and clinical factors in Chinese adult kidney transplant recipients. *J Clin Pharm Ther*. 2017;42(4):425–32.

25. Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RH, Wang LL, et al. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(5):555–65.

26. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(1):19–24.

27. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011;11(4):274–86.

28. Shi WL, Tang HL, Zhai SD. Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127995.

29. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE,

Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):563–85.

30. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem*. 2005;51(8):1374–81.

31. Choi Y, Jiang F, An H, Park HJ, Choi JH, Lee H. A pharmacogenomic study on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy subjects using the DMETTM Plus platform. *Pharmacogenomics J*. 2017;17(1):105–6.

32. Vafadari R, Bouamar R, Hesselink DA, Kraaijeveld R, van Schaik RH, Weimar W, et al. Genetic polymorphisms in ABCB1 influence the pharmacodynamics of tacrolimus. *Ther Drug Monit*. 2013;35(4):459–65.

33. Ogasawara K, Chitnis SD, Gohh RY, Christians U, Akhlaghi F. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) haplotypes significantly affect the pharmacokinetics of tacrolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2013;52(9):751–62.

34. Boivin AA, Cardinal H, Barama A, Naud J, Pichette V, Hebert MJ, et al. Influence of SLCO1B3 genetic variations on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(3):274–7.

35. Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M, et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of

tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2014;36(1):71–9.

36. Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, Bergan S, et al. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(6):685–93.

37. Kurzawski M, Malinowski D, Dziewanowski K, Drozdziak M. Analysis of common polymorphisms within NR1I2 and NR1I3 genes and tacrolimus dose-adjusted concentration in stable kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2017;27(10):372–7.

38. Liu X, Li J, Fu Q, Liu S, Zhang Y, Wang X, et al. Associations of HSD11B1 polymorphisms with tacrolimus concentrations in Chinese renal transplant recipients with prednisone combined therapy. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(4):455–8.

39. Wang J, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Zheng H, Iacono A, et al. Impact of ABCB1 (MDR1) haplotypes on tacrolimus dosing in adult lung transplant patients who are CYP3A5 *3/*3 non-expressors. *Transplant immunology.* 2006;15(3):235–40.

40. Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *British journal of clinical pharmacology.* 2009;68(3):413–21.

41. Wu P, Ni X, Wang M, Xu X, Luo G, Jiang Y. Polymorphisms in CYP3A5*3 and MDR1, and haplotype modulate response to plasma levels of tacrolimus in Chinese renal transplant patients. *Annals of transplantation*. 2011;16(1):54–60.
42. Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*. 2010;19(R2):R131–6.
43. Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, Young D. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. *Prog Transplant*. 2009;19(3):277–84.
44. Nemanja K. Rančić NNV, Aleksandra M. Kovačević, Momir M. Mikov, Viktorija M. Dragojević – Simić. Drug–drug interactions of tacrolimus. *Hospital Pharmacology*. 2015;2(3):291–6.
45. Do R, Kathiresan S, Abecasis GR. Exome sequencing and complex disease: practical aspects of rare variant association studies. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):R1–9.
46. Gulati A, Somlo S. Whole exome sequencing: a state-of-the-art approach for defining (and exploring!) genetic landscapes in pediatric nephrology. *Pediatr Nephrol*. 2017.
47. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*. 2014;30(9):418–26.

48. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* 2002;30(4):363–4.
49. Cenik C, Chua HN, Zhang H, Tarnawsky SP, Akef A, Derti A, et al. Genome analysis reveals interplay between 5'UTR introns and nuclear mRNA export for secretory and mitochondrial genes. *PLoS Genet.* 2011;7(4):e1001366.
50. Rearick D, Prakash A, McSweeney A, Shepard SS, Fedorova L, Fedorov A. Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(6):2357–66.
51. Linear Mixed Effects Models. In: *Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling and Simulation.* SpringerLink: Springer; 2006.
52. Kang HM, Sul JH, Service SK, Zaitlen NA, Kong SY, Freimer NB, et al. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2010;42(4):348–54.
53. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Boso V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(1):38–48.
54. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003;19(1):149–50.
55. World Medical A. World Medical Association Declaration of

Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013;310(20):2191–4.

56. Tatro DS. Drug Interaction Facts. 1st Edition ed: Facts & Comparisons; 2015.

57. Taber DJ, Pilch NA, McGillicuddy JW, Bratton CF, Chavin KD, Baliga PK. Improved patient safety and outcomes with a comprehensive interdisciplinary improvement initiative in kidney transplant recipients. Am J Med Qual. 2013;28(2):103–12.

58. Salgado TM, Moles R, Benrimoj SI, Fernandez-Llimos F. Exploring the role of pharmacists in outpatient dialysis centers: a qualitative study of nephrologist views. Nephrol Dial Transplant. 2013;28(2):397–404.

59. Min SI, Kim SY, Ahn SH, Min SK, Kim SH, Kim YS, et al. CYP3A5 *1 allele: impacts on early acute rejection and graft function in tacrolimus-based renal transplant recipients. Transplantation. 2010;90(12):1394–400.

60. Williams A, Crawford K, Manias E, Ellis C, Mullins K, Howe K, et al. Examining the preparation and ongoing support of adults to take their medications as prescribed in kidney transplantation. J Eval Clin Pract. 2015;21(2):180–6.

61. Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. J Pharmacol Exp Ther. 2003;307(2):573–82.

62. Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7*1C allele. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(9):625–31.
63. Rodriguez-Antona C, Jande M, Rane A, Ingelman-Sundberg M. Identification and phenotype characterization of two CYP3A haplotypes causing different enzymatic capacity in fetal livers. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(4):259–70.
64. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(8):883–91.
65. Betts S, Bjorkhem-Bergman L, Rane A, Ekstrom L. Expression of CYP3A4 and CYP3A7 in Human Foetal Tissues and its Correlation with Nuclear Receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(4):261–6.
66. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Pascual M, Eap CB. CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2008;30(6):689–99.
67. Elens L, Capron A, Kerckhove VV, Lerut J, Mourad M, Lison D, et al. 1199G>A and 2677G>T/A polymorphisms of ABCB1 independently affect tacrolimus concentration in hepatic tissue after liver transplantation. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(10):873–83.

68. Lee SS, Jung HJ, Park JS, Cha IJ, Cho DY, Shin JG. Identification of a null allele of cytochrome P450 3A7: CYP3A7 polymorphism in a Korean population. *Mol Biol Rep.* 2010;37(1):213–7.
69. Lewis BP, Shih IH, Jones–Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003;115(7):787–98.
70. Thompson EE, Kuttub–Boulos H, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. Sequence diversity and haplotype structure at the human CYP3A cluster. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(2):105–14.
71. Birdwell KA, Grady B, Choi L, Xu H, Bian A, Denny JC, et al. The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(1):32–42.
72. Liu MZ, He HY, Zhang YL, Hu YF, He FZ, Luo JQ, et al. IL–3 and CTLA4 gene polymorphisms may influence the tacrolimus dose requirement in Chinese kidney transplant recipients. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(3):415–23.
73. Tamashiro EY, Felipe CR, Genvigir FDV, Rodrigues AC, Campos AB, Hirata RDC, et al. Influence of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus and sirolimus exposure in stable kidney transplant recipients. *Drug Metab Pers Ther.* 2017;32(2):89–95.
74. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der

Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(3):245–54.

75. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP–database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome research.* 1999;9(8):677–9.

76. Migliozi DR, Zullo AR, Collins C, Elsaid KA. Achieving blood pressure control among renal transplant recipients by integrating electronic health technology and clinical pharmacy services. *Am J Health Syst Pharm.* 2015;72(22):1987–92.

77. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Vizzini G, Salis P, et al. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int J Mol Med.* 2011;28(6):1093–102.

78. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol.* 2012;30(5):434–9.

79. Sandmann S, de Graaf AO, Karimi M, van der Reijden BA, Hellstrom–Lindberg E, Jansen JH, et al. Evaluating Variant Calling Tools for Non–Matched Next–Generation Sequencing Data. *Sci Rep.* 2017;7:43169.

80. Zhang G, Wang J, Yang J, Li W, Deng Y, Li J, et al. Comparison and evaluation of two exome capture kits and sequencing platforms for variant calling. *BMC Genomics*. 2015;16:581.
81. Damiani E, Borsani G, Giacomuzzi E. Amplicon-based semiconductor sequencing of human exomes: performance evaluation and optimization strategies. *Hum Genet*. 2016;135(5):499–511.
82. Li CI, Samuels DC, Zhao YY, Shyr Y, Guo Y. Power and sample size calculations for high-throughput sequencing-based experiments. *Brief Bioinform*. 2017.

Abstract

Identification of novel variants associated with tacrolimus concentrations in kidney transplant patients by next generation sequencing

Minji Sohn

College of Pharmacy, Clinical Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Although tacrolimus have been studied widely for variation of its pharmacokinetics (PK), there is currently no consensus on the best individualized dosing method of tacrolimus. The purpose of this study was to identify genotypes associated with tacrolimus dose-adjusted trough concentration (C/D) in Korean kidney transplant recipients using whole-exome sequencing (WES).

A total of 147 patients administering tacrolimus in seventy-five of the discovery set and seventy-two of replication set. Data was collected retrospectively from 80 kidney transplant recipients treated with tacrolimus for the first year. Tacrolimus trough concentrations measured by LC-MS/MS were collected. Average tacrolimus C/D were calculated and log transformed for PK parameters (logC/D) in each period. The genomes of the patients in the discovery set were sequenced using WES. Known tacrolimus pharmacokinetics related intron variants were genotyped. Genetic variants associated with logC/D were analyzed by ANOVA and adjusted by false discovery rate. Haplotype was tested with the variants in same chromosome by Haploview software. Linear mixed effect model was constructed with clinical variables and identified variants in R ver3.4.4.

Ten genes, *NR1I2* on chromosome 3 and *CYP3A7*, *CYP3A5*, *CYP3A4*, *PTCD1*, *CPSF4*, *ZNF789*, *ZKSCAN5*, *FAM200A*, *ZSCAN25* and on chromosome 7, were identified. Among the 16 identified variants, *CYP3A7* rs2257401 was found to be the most significant variant among the periods (between $p = 1.74 \times 10^{-7}$ and $p = 0.0138$). Haplotype was tested with the 13 variants in chromosome 7 showing two linkage disequilibrium blocks. One block included *CYP3A5* variants with *CYP3A4* and *CYP3A7* variants. CYP family diplotype also showed significant difference in each group. Further, *CYP3A7* rs2257401 genotype variant showed a significant difference in

tacrolimus C/D for those expressing *CYP3A5* showing its own effect. The linear mixed effect model was used to account for effect of variants and clinical factors. In linear mixed effect model, age, serum albumin, creatinine, hematocrit and *CYP3A7* rs2257401 was included.

The results suggest that *CYP3A7* rs2257401 may serve as a significant genetic marker for tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplantation.

keywords : next generation sequencing, linear mixed effect model, tacrolimus, concentration, genotype, kidney transplantation

Student Number : 2013–30509